

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Fisiología Animal II**



**TESIS DOCTORAL**

**Cambios conductuales e inmunitarios en el envejecimiento cronológico,  
prematureo y acelerado. Estrategias para una longevidad saludable**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Julia Cruces González**

**Director**

**Mónica de la Fuente del Rey**

**Madrid, 2018**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**CAMBIOS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS**  
**EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO,**  
**PREMATURO Y ACELERADO. ESTRATEGIAS**  
**PARA UNA LONGEVIDAD SALUDABLE.**

**Tesis Doctoral**

**Julia Cruces González**

**Dra. Mónica de la Fuente del Rey**

**Madrid, 2017**



**MÓNICA DE LA FUENTE DEL REY**, Catedrática de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**CAMBIO CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO. ESTRATEGIAS PARA UNA LONGEVIDAD SALUDABLE**”, realizada por **JULIA CRUCES GONZÁLEZ**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 20 de abril de 2017

**VºBº de la Directora de Tesis**

**Dra. Mónica de la Fuente Del Rey**

**Julia Cruces González**



La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con el apoyo económico prestado por los proyectos BFU2008-04336 y BFU2011-30336 del actual Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), PI15/01787 del Fondo de Investigación en Salud (FIS) del ISCIII-FEDER de la Unión Europea, de la Red de Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) (RD06/0013/0003; RD12/0043/0018) del Instituto de Salud Carlos III, del grupo UCM-CM: Envejecimiento, Neuroinmunología y Nutrición (ENEROINN) (Nº 910379), y con la concesión a Julia Cruces González de un Contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación de la Universidad Complutense de Madrid.



*“¿Que cuántos años tengo?*

*¡Qué importa eso!*

*¿Qué importa si cumplo cincuenta, sesenta o más?*

*Pues lo que importa: ¡Es la edad que siento!*

*Tengo los años que necesito para vivir libre y sin miedos*

*Para seguir sin temor por el sendero*

*Pues llevo conmigo la experiencia adquirida*

*Y la fuerza de mis anhelos”*

*Fragmentos del poema ¿Qué cuántos años tengo?*

**José Saramago**

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”*

**Mahatma Gandhi**





Ya ha llegado el gran momento que tanto he esperado, y se me hace difícil creerlo. Ya casi tengo en mis manos este manuscrito que tantas alegrías y quebraderos de cabeza me ha provocado. Después de todo el esfuerzo, por fin cierro este gran capítulo de mi vida. Se agolpan en mí tantas emociones, algunas contradictorias, que cuesta ordenar las ideas para intentar expresar todo lo que siento ahora mismo. Siento tristeza, porque se acaba esta etapa, pero al mismo tiempo alegría y orgullo por haber sido capaz de conseguirlo. Siento inseguridad e inquietud, por no saber qué vendrá después, pero esperanza y entusiasmo por las puertas que se abrirán. Y, por supuesto, en este viaje me han acompañado tantas personas que no puedo dejar de sentir agradecimiento.

He de comenzar mencionando a la persona que ha permitido que yo haya llegado hasta aquí. Mónica, muchísimas gracias. Sin ti, esto no hubiera sido posible. Tu confianza en mí, tu ayuda y tu apoyo han sido claves a lo largo de estos años para formarme no sólo como investigadora sino también para hacerme crecer como persona. Hemos pasado muchos momentos juntas, buenos y malos, y siempre me has escuchado y comprendido y has sabido decirme las palabras exactas para que siguiera luchando cuando las fuerzas flaqueaban. Espero que estés orgullosa de esta Tesis y de mí. Mi respeto y cariño los tendrás siempre.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, tanto los que están como los que ya se fueron. A Lorena e Isabel porque, aunque no estuvimos mucho tiempo juntas, tuve la suerte de poder aprender muchísimo a vuestro lado. A Nuria y Oskarina, por las risas cantando y bailando cuando los experimentos nos hacían traspasar en el laboratorio y por preocuparse por mí durante estos últimos meses, animándome siempre. A Carmen, con la que empecé el periodo experimental de esta tesis (anda que no ha llovido desde el 2008 ¿verdad?) y con la que tantos momentos divertidos he compartido. A Rashed, Ada, Mateo, Carlos, Sara Rodríguez y Virginia, porque con vosotros trabajar en el laboratorio era un placer. A los que están ahora mismo en pleno “fervor”: Carol, ánimo en esta recta final; Irene, sigue trabajando así y, sobre todo, con esa alegría. Querida Noemí, “la niña”, qué te puedo decir que no sepas. Creo en ti, lo estás haciendo y lo harás fenomenal. Sigue así, con ilusión, y no dejes de ser como eres nunca.

Ianire...¡Ay, Iani! Qué complicado es esto... Eres un referente para mí. En lo profesional me has ayudado muchísimo, enseñándome a trabajar adecuadamente, con rigor. Y en lo personal, qué puedo decirte, que ¡eres la

caña! Siempre con ánimo, sincera, buena consejera, empática... Y, sobre todo, mi amiga. Muchas gracias por estar en mi vida.

Gracias, Garrido. Muchísimas gracias. Estas palabras sí que me van a costar. Hay personas que se van metiendo poco a poco en tu vida y, sin saber muy bien cómo, terminan siendo claves en ella. Tú eres una de ellas. Me alegra tanto haberte conocido. Nuestras sobremesas (tú con tu té con leche, yo con mis “barros medicinales”) en la terraza de “Fores” hablando de ciencia eran épicas pero, aquellas en las que arreglamos el mundo, ésas sí que son inolvidables. Gracias por escucharme, aconsejarme y aguantarme. Gracias por ayudarme a ganar confianza en mí misma, a creer en mi valía. Sigue luchando, no decaigas, porque en nada serás un gran Doctor. Yo me conformo con que sigas siendo mi amigo por muchos más años y podamos seguir compartiendo muchos momentos.

No puedo olvidarme de las personas del Departamento que tanto me han ayudado. Especialmente a Ana, gracias por estar ahí, por haber sido incluso mi paño de lágrimas y dejarme tu despacho para desahogarme cuando tenía un mal día. A Teresa Peláez, gracias por recibirme siempre con esa preciosa sonrisa. A Teresa Rodríguez, por las charlas que siempre hacían más llevaderas las tardes. A Julia, gracias por ser la limpiadora más alegre y por sus bizcochos hechos con tanto cariño.

A mis amigos, fuera del mundo científico, por ser mi anclaje a tierra. Gracias Alberto por darme tu amistad ¡tus abrazos y gestos de cariño son los mejores! Ojalá pueda seguir disfrutándolos por mucho tiempo. A Idoia y Ventura, por todos los momentos que hemos compartido, y los que nos quedan. A María, David e Isa porque, aunque no nos vemos mucho, cuando lo hacemos siempre es divertido. Gracias a Coral (mi Bambina) y a Raúl ya que, a pesar de la distancia, os siento cerca. A Pizarro, a su gente. Gran parte de este manuscrito lo he escrito allí. Gracias por la paz y la tranquilidad que necesitaba para abordar este proyecto. A “los vecis”: Ana, Jose Murillo, Jose Palomo, Pedro y Elena, por brindarme su amistad desde el principio haciéndome sentir como en casa siempre que estoy con ellos ¡Gracias amigos! Estoy muy agradecida por haberos encontrado. A Sergio, Antonio, Carmen, Rubén, Marián y el resto de personas del “20 paká” por haberme hecho un hueco en el grupo, sintiéndome una más. Ojalá disfrutemos de muchas más “jiras”, “castañas”, cumpleaños y fiestas varias. A los pequeños: Alicia, Julieta y Héctor, porque siempre me sacan una sonrisa y me hacen feliz sólo con un abrazo o cuando me cogen de la mano.

A los Guillén-García, especialmente a Nani y Jose por hacerme sentir querida y una más de la familia desde el primer momento. Gracias a Tati, Patri, Flo, Estefanía, Miguel y Laura por acogirme siempre con una sonrisa. A Eneas, una personita adorable.

Gracias a toda mi familia. A mi abuelo Pepe, a Paz y a Lino que, aunque ya no estéis aquí, permanecéis en mi recuerdo y espero que os sintáis orgullosos al ver dónde he llegado. A mis abuelas Virginia y Carmen, un ejemplo de esfuerzo y sacrificio. Gracias Ana por ser tú, somos familia desde el momento que entré en tu casa con 4 meses, siempre me has dado cariño, apoyado, escuchado, soportado,... Te quiero. Junto con Vidal, conformáis dos pilares importantísimos en mi vida.

Muchas gracias Marta. Somos muy diferentes (bueno, a lo mejor no tanto) pero no habría querido tener otra hermana que no fueras tú. Estoy muy orgullosa de ti, al ver la gran mujer en que te has convertido. Gracias por escucharme e incluso regañarme cuando no estaba haciendo bien las cosas, por las risas incontrolables, por las conversaciones absurdas que sólo compartimos las dos. Sé que siempre te tendré ahí, igual que tú me tienes a mí. Te quiero, “mona”. Fernando, cuídamela. Os deseo lo mejor a los dos.

Gracias Narciso y Julia, papá y mamá, por estar siempre. Por darme todo lo que ha estado en vuestras manos para lograr mis sueños. Sois un ejemplo para mí, ya lo sabéis. Os admiro y respeto profundamente por haber educado a vuestras dos hijas en el esfuerzo y la superación, siempre dispuestos a apoyarnos en nuestras decisiones sin cortar nuestras alas. Sois unos grandes padres, los mejores. Os dedico esta tesis a vosotros, os lo merecéis todo. Os quiero.

Y, finalmente... ¡Muchísimas gracias, Jose! La vida me dio una sorpresa maravillosa, en un momento en el que casi no esperaba nada de ella. Estaba “secuestrada” y me liberaste. Has aguantado este proceso como un campeón, sufriendo mis altibajos durante la escritura del manuscrito e intentando siempre entenderme. En parte, esta tesis ha llegado a buen fin gracias a ti, no es la primera vez que te lo digo. Gracias por hacer fácil lo más difícil, por sacarme una sonrisa hasta en mis días más negros, por tu cariño, por creer en mí, por quererme tanto. No sé qué nos deparará el futuro (¿y quién lo sabe?) pero, venga lo que venga, espero disfrutarlo junto a ti. Te quiero.

¡Muchísimas gracias a todos!

*A mis padres, con todo mi amor*



## ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
A	Adrenalina
A	Adrenalina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa (del inglés, <i>Adrenocorticotropic Hormone</i> ).
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés, <i>Antigen Presenting Cell</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor Neurotrófico derivado de Cerebro (del inglés, <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Catecolaminas
CAT	Catalasa
CCL	Ligando de quimioquina con motivos C-C
CD	Complejo de diferenciación (del inglés, <i>Cluster of Differentiation</i> )
ConA	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
CRH	Hormona liberadora de corticotropina (del inglés, <i>Corticotropin-Releasing Hormone</i> )
DA	Dopamina
DHEA	Hormona dehidroepiandrosterona
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EA	Enriquecimiento ambiental
EF	Eficacia de fagocitosis
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
EPM	Laberinto en cruz elevado (del inglés, <i>Elevated-Plus Maze</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	Péptido formilado N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (f-Met-Leu-Phe)
GC	Glucocorticoides
GH	Hormona del Crecimiento
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GR	Receptor de glucocorticoides

GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n disulfuro o glutati3n oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per3xido de hidr3geno
HHA	Eje Hipot3lamo-Hip3fisis-Adrenal
IF	3ndice de fagocitosis
IFN	Interfer3n
IL	Interleuquina
IQ	3ndice de quimiotaxis
LPS	Lipopolisac3rido (de la membrana de <i>E.coli</i> )
MDA	Malonildialdeh3do
MIF	Factor de inhibici3n migratoria de macr3fagos (del ingl3s, <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> )
MR	Receptor de mineralocorticoides
NA	Noradrenalina
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato, forma reducida
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las c3lulas B
NGF	Factor del Crecimiento Nervioso (del ingl3s, <i>Nerve Growth Factor</i> )
NK	Asesinas naturales, del ingl3s <i>Natural killer</i>
NPAM	Ratones no prematuramente envejecidos (del ingl3s, <i>Non-Prematurely Aging Mice</i> )
NPY	Neurop3ptido Y
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ani3n super3xido
OH <sup>·</sup>	Radical hidr3xilo
PAM	Ratones prematuramente envejecidos (del ingl3s, <i>Prematurely Aging Mice</i> )
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PRL	Prolactina
PVN	N3cleo paraventricular hipotal3mico (del ingl3s, <i>Paraventricular nucleus</i> )
ROS	Especies Reactivas de Ox3geno
SAM	Eje Simp3tico-Adreno-Medular
SOD	Super3xido dismutasa
TCA	3cido tricloroac3tico
TCR	Receptor ant3geno-espec3fico de las c3lulas T
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta (del ingl3s, <i>Transforming Growth Factor β</i> )
Th	Linfocito T <i>helper</i> o cooperador
TLR	Receptor de tipo Toll (del ingl3s, <i>Toll-like receptor</i> )

TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
XO	Xantina oxidasa





# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>27</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>35</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>43</b>
1.1. EL ENVEJECIMIENTO.....	43
1.1.1. Definición del envejecimiento y sus características. La longevidad.....	43
1.1.2. El concepto de edad biológica y longevidad.....	44
1.1.3. ¿Cómo, dónde y por qué envejecemos? Teorías del envejecimiento.....	45
1.2. LOS SISTEMAS REGULADORES, LA COMUNICACIÓN PSICONEUROINMUNOENDOCRINA Y EL ENVEJECIMIENTO.....	50
1.2.1. El envejecimiento de los sistemas nervioso y endocrino.....	52
1.2.2. El envejecimiento del sistema inmunitario: la inmunosenescencia.....	54
1.2.2.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad.....	55
1.2.2.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad.....	57
<i>La inmunidad innata</i> .....	59
<i>La inmunidad adaptativa</i> .....	63
<i>Las citoquinas</i> .....	66
1.2.3. La oxidación-inflamación como causa y efecto de la inmunosenescencia.....	69
1.2.4. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad.....	72
1.2.5. La comunicación psiconeuroinmunoendocrina se modifica con el envejecimiento.....	73
1.3. EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LOS SISTEMAS REGULADORES Y LA COMUNICACIÓN PSICONEUROINMUNOENDOCRINA.....	74
1.3.1. La respuesta neuroendocrina al estrés.....	76
<i>Estrés agudo vs estrés crónico</i> .....	79
1.3.2. Efectos del estrés sobre el sistema inmunitario.....	80
<i>Estrés psicológico y las inmunidades innata y adquirida</i> .....	82
<i>Estrés psicológico y citoquinas</i> .....	84

1.3.3. Factores moduladores de la respuesta al estrés: resiliencia, hormesis y ansiedad.....	85
1.3.4. Un modelo de envejecimiento prematuro natural en ratón basado en una inadecuada respuesta al estrés: los PAM ( <i>Prematurely Aging Mice</i> ).....	87
1.4. SITUACIONES QUE ACELERAN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO: AISLAMIENTO SOCIAL/SOLEDAD Y SEPARACIÓN MATERNA.....	90
1.4.1. Soledad vs aislamiento social. La importancia de los modelos animales de aislamiento social.....	92
1.4.2. Efectos del aislamiento social/soledad sobre los sistemas nervioso y endocrino.....	93
<i>Efectos del aislamiento social/la soledad sobre los ejes HHA y SAM</i> .....	93
<i>Efectos del aislamiento social sobre la conducta y funciones cognitivas</i> .....	94
1.4.3. Efectos del aislamiento social/soledad sobre el sistema inmunitario.....	95
<i>Cambios a nivel de la expresión génica en las células inmunitarias</i> .....	96
<i>Cambios en la inmunidad innata y adquirida</i> .....	96
<i>Cambios en las citoquinas</i> .....	97
1.4.4. Efectos de la separación materna sobre los sistemas reguladores.....	97
<i>Cambios en los sistemas nervioso y endocrino</i> .....	98
<i>Cambios en el sistema inmunitario</i> .....	100
<i>Cambios en las citoquinas</i> .....	101
1.5. ESTRATEGIAS QUE RALENTIZAN EL ENVEJECIMIENTO.....	101
1.5.1. Estrategias de enriquecimiento ambiental.....	103
<i>La hidroterapia como una nueva estrategia de EA</i> .....	105
1.5.2. Otras estrategias para ralentizar el envejecimiento.....	107
<i>Efectos del Nutrisim®</i> .....	107
<i>Efectos del atenolol</i> .....	108
<i>Efectos de los nanopulsos</i> .....	108
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>113</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>123</b>
3.1. MATERIAL.....	123
3.1.1. Material biológico.....	123
3.1.1.1. Animales.....	123

3.1.1.2. Líneas celulares.....	124
3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas.....	124
3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura.....	124
3.1.2.2. Medios comerciales.....	125
3.1.3. Reactivos y <i>kits</i> comerciales.....	126
3.1.4. Material de laboratorio.....	128
3.1.5. Aparataje.....	128
3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	130
3.2.1. Profundización y nuevas aproximaciones en el estudio de la inmunosenescencia en el envejecimiento cronológico en ratones.....	130
3.2.1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.....	130
3.2.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.....	131
3.2.2. Profundización en parámetros conductuales e inmunitarios en ratones prematuramente envejecidos (PAM).....	133
3.2.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.....	133
3.2.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.....	134
3.2.3. Estudio de los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en modelos murinos a diferentes edades.....	135
3.2.3.1. Efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.....	135
3.2.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre la función y el estrés oxidativo en ratas macho.....	137
3.2.3.3. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos.....	138
3.2.3.4. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad.....	140
3.2.4. Estrategias de enriquecimiento ambiental para mejorar parámetros conductuales así como de función y estrés oxidativo en leucocitos de ratones con envejecimiento cronológico, prematuro y acelerado.....	142
3.2.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.....	142

3.2.4.2. Efecto del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	144
3.2.4.3. Efecto del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.....	146
3.2.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.....	148
3.2.5. Utilización de estrategias para mejorar la conducta de ratones con envejecimiento cronológico, así como la función y estrés oxidativo de sus leucocitos.....	150
3.2.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.....	150
3.2.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	151
3.2.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.....	154
3.2.5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones viejos.....	155
3.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	157
3.3.1. Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM).....	157
3.3.2. Protocolo de aislamiento social.....	158
3.3.3. Protocolos de enriquecimiento ambiental.....	158
<i>Enriquecimiento ambiental con juguetes</i> .....	158
<i>Hidroterapia</i> .....	159
3.3.4. Estudios conductuales.....	159
3.3.4.1. Pruebas conductuales para evaluar las capacidades sensoriomotoras.....	160
3.3.4.2. Pruebas de exploración y respuestas de ansiedad.....	163
3.3.4.3. Pruebas conductuales para determinar los niveles de ansiedad.....	168
3.3.4.4. Evaluación de la actividad física voluntaria con la rueda de actividad.....	172
3.3.5. Obtención de muestras biológicas.....	172

3.3.5.1. Obtención de órganos inmunitarios.....	172
3.3.5.2. Obtención de leucocitos esplénicos y tímicos. Recuento y análisis de la viabilidad celular.....	172
3.3.5.3. Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y análisis de la viabilidad celular.....	174
3.3.5.4. Obtención de linfocitos T peritoneales.....	175
<i>Caracterización de la subpoblación de linfocitos T peritoneales mediante citometría.....</i>	175
3.3.6. Mantenimiento de la línea tumoral murina YAC-1.....	176
3.3.7. Estudio de las funciones de las células inmunitarias.....	178
3.3.7.1. Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos.....	178
3.3.7.2. Capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales.....	179
3.3.7.3. Concentraciones intracelulares de anión superóxido de los macrófagos peritoneales.....	180
3.3.7.4. Actividad citotóxica <i>Natural killer</i> de los leucocitos.....	180
3.3.7.5. Capacidad proliferativa de los leucocitos.....	182
3.3.7.6. Concentraciones de citoquinas determinados mediante técnicas de luminometría a partir de cultivos de leucocitos.....	184
<i>Determinación de las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos esplénicos de rata en cultivo.....</i>	184
<i>Determinación de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos peritoneales de ratón.....</i>	186
3.3.8. Estudio de parámetros de estrés oxidativo.....	188
3.3.8.1. Actividad de la enzima Xantina Oxidasa.....	188
3.3.8.2. Actividad de la enzima Catalasa.....	189
3.3.8.3. Concentraciones de Glutati6n reducido y Glutati6n oxidado. Cociente GSSG/GSH o 6ndice redox.....	191
3.3.8.4. Actividad de la enzima Glutati6n Peroxidasa.....	192
3.3.8.5. Actividad de la enzima Glutati6n Reductasa.....	195
3.3.8.6. Concentraci6n intracelular de Glutati6n Total.....	197
3.3.8.7. Concentraci6n de especies reactivas de ox6geno intracelulares.....	199
3.3.9. Estudio de la longevidad media.....	200
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	200
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>205</b>

4.1. PROFUNDIZACIÓN Y NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DE LA INMUNOSENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO EN RATONES.....	205
4.1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.....	205
4.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.....	206
4.2. PROFUNDIZACIÓN EN PARÁMETROS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN RATONES PREMATURAMENTE ENVEJECIDOS (PAM).....	212
4.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.....	212
4.2.1.1. Actividad física voluntaria.....	212
4.2.1.2. Conducta de ansiedad.....	213
<i>Conducta de anidación</i> .....	213
<i>Conducta de enterramiento</i> .....	215
4.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.....	216
4.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL Y DE LA ANSIEDAD EN MODELOS MURINOS A DIFERENTES EDADES.....	219
4.3.1. Efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.....	219
4.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre la función y el estrés oxidativo en ratas macho.....	221
4.3.3. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos.....	228
4.3.4. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad.....	236
4.4. ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL PARA MEJORAR PARÁMETROS CONDUCTUALES ASÍ COMO DE FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO.....	257
4.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.....	257
4.4.2. Efecto del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	270

4.4.3. Efecto del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.....	282
4.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.....	286
4.5. UTILIZACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CONDUCTA DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, ASÍ COMO LA FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO DE SUS LEUCOCITOS.....	301
4.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.....	301
4.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	304
4.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.....	317
4.5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones viejos.....	320
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>325</b>
5.1. PROFUNDIZACIÓN Y NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DE LA INMUNOSENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO EN RATONES.....	325
5.1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.....	325
5.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.....	326
5.2. PROFUNDIZACIÓN EN PARÁMETROS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN RATONES PREMATURAMENTE ENVEJECIDOS (PAM).....	331
5.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.....	331
5.2.1.1. Actividad física voluntaria.....	331
5.2.1.2. Conducta de ansiedad.....	332
5.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.....	334
5.3. EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL Y DE LA ANSIEDAD EN MODELOS MURINOS A DIFERENTES EDADES.....	336
5.3.1. Efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.....	336



5.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre la función y el estrés oxidativo en ratas macho.....	341
5.3.3. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos.....	347
5.3.4. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad.....	354
5.4. ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL PARA MEJORAR PARÁMETROS CONDUCTUALES ASÍ COMO DE FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO.....	362
5.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.....	363
5.4.2. Efecto del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	373
5.4.3. Efecto del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.....	382
5.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.....	387
5.5. UTILIZACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CONDUCTA DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, ASÍ COMO LA FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO DE SUS LEUCOCITOS.....	394
5.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.....	394
5.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.....	397
5.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.....	401
5.5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función de leucocitos en ratones viejos.....	405
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>411</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>417</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>481</b>

# **Resumen**



### **CAMBIOS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO. ESTRATEGIAS PARA UNA LONGEVIDAD SALUDABLE.**

El envejecimiento es un proceso universal, intrínseco, progresivo y deletéreo que podría definirse como el conjunto de cambios que afectan a todas nuestras células y tejidos al avanzar la edad, llevando a una pérdida progresiva de nuestras capacidades fisiológicas así como a una incapacidad para mantener la homeocinesis. Así mismo, el envejecimiento también se caracteriza por su heterogeneidad, de manera que no todos los cambios que suceden en los sistemas de un organismo se producen a la misma velocidad, así como tampoco lo hacen los individuos con una misma edad cronológica, lo que hace surgir el concepto de “edad biológica”, considerado un mejor indicador de la velocidad a la que envejece un individuo que la edad cronológica y siendo, por tanto, determinante de su esperanza de vida. Según la teoría de la oxidación-inflamación, este deterioro asociado con la edad sería consecuencia de un estrés oxidativo crónico asociado a un estrés inflamatorio, los cuales afectarían a todas las células, pero de manera más relevante a las de los sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario. La afectación de estos sistemas y, consecuentemente, de la comunicación entre ellos (comunicación psiconeuroinmunoendocrina) deteriora la homeocinesis y aumenta la morbilidad y mortalidad. Además, en esta teoría se propone que dadas las características del sistema inmunitario, el cual necesita producir oxidantes y compuestos inflamatorios en su función defensiva frente a patógenos y cánceres, si dicha producción no está bien regulada, puede entrar en un círculo vicioso que aumente el estrés oxidativo e inflamatorio del organismo. De esta forma, se sugiere que el sistema inmunitario no sólo puede modular la velocidad de envejecimiento de cada individuo sino que su capacidad funcional supone un excelente marcador del estado de salud. Los cambios que afectan al sistema inmunitario al envejecer se recogen bajo el término de inmunosenescencia y abarcan todos los niveles de organización de dicho sistema, desde genético hasta funcional. Además, dichos cambios estarían implicados en el aumento de la susceptibilidad a sufrir procesos infecciosos, autoinmunes o cánceres, y en la mayor severidad de los mismos, con los consecuentes efectos deletéreos sobre la salud. A pesar de los avances en el conocimiento de la inmunosenescencia, siguen hallándose lagunas y controversias por lo que se hace necesario profundizar en el mismo. Dado que la evolución de los cambios que suceden con el proceso de envejecimiento, particularmente en ciertos aspectos de los sistemas reguladores, sigue un patrón bastante similar en ratón y humano, junto con la imposibilidad de realizar estudios longitudinales en el ser humano al tener una elevada esperanza de vida, el desarrollo de modelos murinos resulta muy útil para avanzar en el conocimiento de dicho proceso. Por su parte, en el contexto de la heterogeneidad del envejecimiento, existen individuos que muestran, ya en su edad adulta, alteraciones neuroendocrinas e inmunitarias propias de la vejez, pudiéndose decir de ellos que se encuentran envejecidos prematuramente. Nuestro grupo de investigación viene caracterizando desde hace años un modelo de envejecimiento prematuro en ratones en el que los animales adultos con una inadecuada respuesta conductual a situaciones estresantes y unos elevados niveles de ansiedad muestran, además de otras alteraciones conductuales y neurológicas, unas

funciones de las células inmunitarias y un estrés oxidativo en las mismas característicos de animales viejos. El hecho de que estos animales presenten este envejecimiento fisiológico prematuro y de que, además, vivan menos en comparación con sus congéneres de similar edad cronológica, que no demuestran esa inadecuada respuesta al estrés, nos llevó a denominarlos Prematurely Aging Mice (PAM). No obstante, a pesar de los numerosos trabajos que se han llevado a cabo en los PAM por nuestro grupo de investigación, aún se desconocen muchos aspectos conductuales e inmunitarios en los mismos.

Por otro lado, el envejecimiento es un proceso fisiológico inevitable pero modulable, de manera que diversos factores pueden incidir sobre el mismo, acelerando o frenando la velocidad a la que se produce y, consecuentemente, aumentando o disminuyendo la edad biológica del individuo. Uno de los factores que podrían acelerar la senescencia en las especies sociales, como la humana o los roedores, es la soledad o el aislamiento social, considerados como un potente estrés psicológico que llevaría al deterioro del normal funcionamiento del organismo y, particularmente de los sistemas reguladores y de la comunicación entre ellos, siendo un factor de riesgo de morbilidad y mortalidad. Los posibles efectos deletéreos del aislamiento y la soledad sobre la fisiología de los sistemas reguladores pueden afectar al individuo social en cualquiera de las etapas de su vida. No obstante es en la infancia y especialmente en la vejez cuando resultan más perjudiciales, y es precisamente al avanzar la edad cuando aumenta la vulnerabilidad a sufrir estas situaciones, pudiendo actuar como aceleradores del proceso de senescencia afectando, en última instancia, el estado de salud en las últimas etapas de la vida e incluso acortar la longevidad del individuo. No obstante, las características propias de cada sujeto como su edad y sexo así como su reactividad al estrés o sus niveles de ansiedad previos o durante la exposición al mismo, podrían modificar los efectos negativos del aislamiento social o la soledad sobre el estado de salud. Al igual que existen factores que pueden acelerar la senescencia, es posible diseñar intervenciones o estrategias con el fin de ralentizar los efectos deletéreos del envejecimiento sobre el organismo así como disminuir las probabilidades de padecer enfermedades asociadas con la edad. Así, el “enriquecimiento ambiental” (EA) mediante la introducción de objetos en las jaulas de estabulación supone una aproximación experimental en animales de experimentación al mantenimiento de una vida intelectual, física y social activa en humanos, que induciría beneficios sobre el funcionamiento de los sistemas reguladores, frenando el proceso de senescencia e incluso alargando la vida de los individuos expuestos al mismo. Por otra parte, desde tiempos muy antiguos se conocen los beneficios de la terapia de baños o balneoterapia, especialmente en la vejez, por lo que la hidroterapia o tratamiento de baños podría revertir, al igual que el enriquecimiento con objetos, el deterioro conductual e inmunitario característicos del envejecimiento y alargar la longevidad media de los individuos, postulándose como una nueva estrategia de EA. Conociendo las propiedades beneficiosas sobre el estado de salud de las aguas mineralo-medicinales, la hidroterapia empleando este tipo de aguas podría potenciar dicho efecto positivo sobre el declive de los sistemas reguladores asociado con la edad. Además de las estrategias de EA comentadas anteriormente, demostradas o potenciales, existen gran variedad de intervenciones de estilo de vida que han demostrado su

capacidad para ralentizar e incluso revertir los efectos deletéreos del envejecimiento sobre el organismo, llegando incluso a alargar la vida del individuo. En este sentido, otras intervenciones, de distinta naturaleza a las más comúnmente estudiadas, podrían ejercer un posible efecto beneficioso sobre los sistemas reguladores en la vejez y, por tanto, sobre el estado de salud en estas últimas etapas de la vida, pudiendo tener éstas una prometedora traslación al ser humano.

Por todo ello, los objetivos planteados en la presente Tesis fueron:

**1º objetivo:** profundizar así como abordar nuevas aproximaciones en el estudio de la inmunosenescencia en el envejecimiento cronológico en ratones, realizando estudios longitudinales en los que determinar cómo varía la elasticidad de la membrana de los linfocitos T al envejecer y si existe una relación entre dicho parámetro y la longevidad del individuo así como analizar las modificaciones en las concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y reguladoras tanto intracelulares como secretadas por leucocitos peritoneales cultivados en estado de reposo o de estimulación con mitógenos, a lo largo de la edad.

**2º objetivo:** profundizar en la hiperreactividad al estrés y las respuestas de ansiedad de los ratones prematuramente envejecidos (PAM) adultos así como en estudiar cómo se encuentra afectada la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y reguladoras por parte de los leucocitos peritoneales en estado de reposo o de estimulación con mitógenos en estos ratones prematuramente envejecidos con respecto a los correspondientes NPAM de igual edad cronológica.

**3º objetivo:** estudiar los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en distintas etapas de la vida (periodo postnatal, edad adulta y vejez) sobre el funcionamiento de los sistemas nervioso e inmunitario así como sobre la esperanza de vida media en modelos murinos de rata y ratón.

**4º objetivo:** profundizar en el efecto del EA con juguetes para mejorar parámetros conductuales, de función y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales así como sobre la longevidad media en ratones cronológicamente viejos y prematuramente envejecidos (PAM). Determinar si la hidroterapia con agua corriente podría postularse como una nueva estrategia de EA válida para revertir el deterioro funcional de los sistemas reguladores y para alargar la vida, tanto en el envejecimiento fisiológico como acelerado, así como estudiar si el empleo de aguas mineralo-medicinales pudiera potenciar dicho efecto de la hidroterapia en la madurez y en la vejez.

**5º objetivo:** aplicar una serie de estrategias, de distinta naturaleza a las comúnmente estudiadas, con el fin de estudiar sus posibles efectos positivos sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos peritoneales y en la longevidad media de ratones durante el envejecimiento cronológico. Estas estrategias son: la ingesta de un agua mineralo-medicinal, un tratamiento con Nutrisim® (compuesto natural con acción anti-inflamatoria previamente demostrada), un tratamiento crónico con el fármaco  $\beta$ 1 bloqueante atenolol o una terapia con nanopulsos eléctricos.

Los **resultados** y las **conclusiones** del 1º objetivo indican que al avanzar la edad no se modifica el módulo elástico E, esto es la elasticidad, de la membrana de los linfocitos T peritoneales ni tampoco existe una relación entre los valores de dicho parámetro en la edad adulta-madura y la esperanza de vida del individuo. Por el contrario, en ratón, al envejecer la red de citoquinas experimenta profundas modificaciones. Así, al avanzar la edad, los leucocitos en estado de reposo aumentan la secreción de algunas citoquinas pro-inflamatorias, particularmente IL1 $\beta$  e IL6, descendiendo la liberación de la anti-inflamatoria IL10. Además, el contenido intracelular de dichos mediadores en los leucocitos, también sufren cambios con el envejecimiento, destacándose un aumento de la concentración de la citoquina pro-inflamatoria IL6 así como de la anti-inflamatoria IL10. Estos resultados confirman el papel clave de las células inmunitarias en el establecimiento y mantenimiento de la inflamación “estéril” crónica y de bajo grado que se produce en el envejecimiento y que contribuyen a la inmunosenescencia que experimentan dichas células, produciéndose y liberándose compuestos inflamatorios junto con una merma de las defensas antiinflamatorias, en ausencia de un antígeno o estímulo. Además, conforme avanza la edad, en presencia de estímulos (los mitógenos LPS y ConA que mimetizan in vitro el efecto in vivo de los antígenos), los leucocitos secretan y contienen menores concentraciones de citoquinas, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, lo que corrobora la pérdida funcional de estas células para iniciar una respuesta inmunitaria adecuada. En cuanto al 2º objetivo, los resultados indican que los PAM adultos manifiestan mayor actividad física voluntaria y conducta de enterramiento además de un deterioro de la conducta de anidación con respecto a los NPAM, corroborando la hiperreactividad al estrés y los mayores niveles de ansiedad de estos ratones, que son características de individuos cronológicamente viejos. Así mismo, ya en la edad adulta, los leucocitos peritoneales de los PAM en estado de reposo manifiestan una inflamación “estéril”, liberando mayores cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y de la reguladora IL17 así como menores de la anti-inflamatoria IL10, con respecto a los NPAM y de forma similar a lo que ocurre al envejecer. Además, esta inflamación contribuiría a la inmunosenescencia prematura característica de los PAM, confirmada en los resultados de este objetivo, dado que en presencia de LPS y ConA, los leucocitos de PAM liberan menores cantidades de citoquinas tanto pro-inflamatorias como de la anti-inflamatoria IL10 y de las reguladoras IL17 e IL2 en relación a los NPAM y, de nuevo, de forma similar a lo que acontece al avanzar la edad. Todos estos resultados suponen una corroboración de que esos ratones son un modelo natural de envejecimiento prematuro. En lo referente al 3º objetivo, los resultados extraídos del mismo apuntan que el estrés psicológico que sufren las crías al separarse de su madre durante 3 horas diarias a lo largo del periodo de lactancia induce en éstas, al ser adultas, un deterioro de la capacidad de proliferación de los leucocitos esplénicos y tímicos. Por tanto, atravesar una situación psicológicamente negativa en las primeras etapas de la vida impacta de tal forma sobre el organismo, que en la edad adulta sigue dándose un declive funcional de la inmunidad adaptativa, similar al observado en el envejecimiento fisiológico. Por su parte, padecer aislamiento social y, particularmente enfrentarse y responder al mismo con altos niveles de ansiedad, así como ser un individuo ansioso sin enfrentarse a ningún estrés psicológico, agrava el deterioro de algunas funciones inmunitarias y el estrés oxidativo de los

leucocitos de ratas y ratones viejos, experimentando éstos un envejecimiento acelerado. Esto se refleja en la menor esperanza de vida media mostrada por los ratones viejos. Así mismo, padecer aislamiento social en la edad adulta, especialmente en los ratones más ansiosos, o mostrar elevados niveles de ansiedad sin sufrir estrés psicológico alguno también produce un deterioro conductual e inmunitario así como un descenso de algunas defensas antioxidantes en los leucocitos peritoneales, similar al observado en el envejecimiento cronológico y prematuro, sin modificar la esperanza de vida de los individuos. Por tanto, el estrés psicosocial en distintas etapas de la vida, supone una aceleración del proceso de senescencia en los roedores, aumentando su riesgo de morbilidad y mortalidad en los individuos que lo padecen. Los resultados relativos al 4º objetivo indican que tanto los ratones viejos como los adultos PAM expuestos a enriquecimiento ambiental (EA) con juguetes, incluso durante un periodo corto de tiempo, experimentan una notable mejora de algunos parámetros de conducta así como de función inmunitaria y de estado redox de los leucocitos peritoneales. Además, en el caso de los PAM, estos hechos se reflejan en una mayor longevidad media, la cual se asemeja a la de los NPAM. Así mismo, la hidroterapia con agua corriente induce una mejora conductual e inmunitaria similar a la del EA con juguetes, tanto en los ratones viejos como en los viejos aislados, alargando su esperanza de vida media. Dichos efectos beneficiosos se potencian con el empleo de unas aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuros. Por todo ello, se confirma que el EA con juguetes es una estrategia efectiva para reducir la edad biológica del individuo así como para alargar su esperanza de vida media cuando dicha exposición se inicia en la edad adulta. Además, dadas las similitudes en cuanto a los efectos sobre la funcionalidad de los sistemas reguladores entre este tipo de EA con la hidroterapia, la terapia de baños puede ser considerada una nueva estrategia de EA para mejorar la calidad de vida de los individuos así como también para alargar su longevidad media. Los beneficios de la hidroterapia se ven potenciados mediante el empleo de agua mineralo-medicinal rica en sulfuros. Finalmente, en cuanto al 5º objetivo, los resultados obtenidos apuntan que la ingesta de agua mineralo-medicinal rica en sulfuros mejora algunos parámetros funcionales de la inmunidad innata en los ratones maduros. Por otra parte, un tratamiento con Nutrisim®, particularmente de 4 semanas de duración, es capaz de revertir el deterioro conductual e inmunitario así como de atenuar el estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales de ratones viejos. El tratamiento crónico con atenolol mejora la inmunidad en la vejez. También, una terapia de corta duración empleando nanopulsos mejora notablemente el funcionamiento del sistema inmunitario en la vejez. Por lo tanto, las intervenciones utilizadas en este 5º objetivo, de una naturaleza diferente a la de las comúnmente utilizadas, se postulan como potentes estrategias válidas para mejorar e incluso revertir el deterioro que experimentan los sistemas reguladores al envejecer y, por tanto, para alcanzar una longevidad saludable.

**Palabras clave:** Envejecimiento, Neuroinmunología, Aislamiento Social, Ansiedad, Estrategias Anti-Envejecimiento.





# ***Abstract***



**BEHAVIORAL AND IMMUNOLOGICAL CHANGES IN CHRONOLOGICAL, PREMATURE AND ACCELERATED AGING. STRATEGIES TO ACHIEVE A HEALTHY LONGEVITY.**

Aging is a universal, intrinsic, progressive and deleterious process which induces changes affecting the whole organism, leading to a continual loss of the physiological capacities as well as an inability to maintain the homeocinetic balance. In addition, the aging process is characterized by its great heterogeneity, since there are different rates of physiological changes in the various systems of organization of the organism as well as within the individuals of the same population with the same chronological age. This phenomenon led to the concept of "biological age", which is a better indicator than chronological age to determine the rate of aging and, consequently, the life expectancy of each subject. According to the oxi-inflamm-aging theory, the age-related decline is the result of the establishment of an oxidative and inflammatory chronic stress affecting the whole organism, specially the regulatory systems namely the nervous, endocrine and immune systems. This age-associated impairment of the regulatory systems leads to the loss of the communication between them (the psychoneuroimmunoendocrine communication) and consequently to the loss of homeocinesis, increasing morbidity and mortality. Moreover, as a consequence of its defensive activity against pathogens and tumorigenic processes, the immune cells produce great amount of oxidant and inflammatory compounds. Thus, the inflammation and oxidative stress generated by leukocytes throughout life in physiological conditions, when not perfectly regulated, may aggravate the age-related oxidative and inflammatory chronic stress of the organism. Moreover, it has been proposed that the immune system not only modulates the rate of aging of each subject but also its functional capacity may be considered an excellent marker of health status. The age-related changes in the immune system are known as immunosenescence and they affect all the organization levels of this system, from genes to functional levels, increasing the vulnerability and severity to infections as well as to autoimmune and tumorigenic processes, exerting deleterious effects on health. Despite the advances in the knowledge of immunosenescence, it remains some gaps and controversial results needed to be studied. Given the similarity regarding the age-associated changes between human and mice and the long life-expectancy of human, murine models may constitute an important tool to study the effects of aging on the organism and particularly on the regulatory systems as well as on the communication between them. Besides, as the aging process is heterogeneous, there are subjects which exhibit in adulthood neuroendocrine and immune changes similar to those found in aged individuals. These subjects may be considered as prematurely aged. In this context, our research group has developed a model of premature aging in mice which show in adulthood inadequate behavioral responses to stressful situations and high anxiety levels, among other behavioral and neurological alterations, as well as impaired immune functionality and higher oxidative stress in leukocytes similar which are characteristic of aged individuals. Moreover, these adult mice exhibit a shorter life span than its counterparts of the same chronological age. Thus, we designated these mice as Prematurely aging Mice (PAM), in contrast to None Prematurely Aging Mice (NPAM), which respond adequately to stressful situations and exhibit a correct neuroendocrine and immune functions and a longer life span. Nevertheless,

despite the great amount of studies we performed on PAM, it stills some behavioral and immunological aspects to investigate in this model of premature aging.

The aging process is unavoidable but it could be modulate. Thus, diverse factors may act on this process, accelerating or slowing down its rate and, consequently, increasing or reducing the biological age. One of these factors which may accelerate the rate of aging in social species, as human and rodents, is loneliness or social isolation. Both are considered as potent psychological stressors leading to a deterioration of the normal functioning of the organism and particularly of the regulatory systems as well as of the communication between them. Thus, loneliness and social isolation are major risks factors of morbidity and mortality in social species. The negative effects of isolation and loneliness on the regulatory systems may affect the individual throughout its life. However, suffering this kind of stressors in the first stages of life or in elderly may be even more detrimental to health. Indeed, the vulnerability to loneliness and social isolation increases in elderly and suffering both stressors in the last stages of life may accelerate senescence, strongly affecting health status and even shortening life expectancy. However, the response to loneliness or social isolation may be influenced by inherent factors to the individual such as its age or gender as well its reactivity to stress or the anxiety levels exhibit by the subject before or during the exposure to these situations. Besides, there are other factors that may exert positive effects on the age-related decline of the organism. In this context, diverse interventions or strategies in the aging process may control its rate, reducing the vulnerability to suffer pathologies. Thus, environmental enrichment (EE) introducing objects in the rodent cage, represents an experimental approach in animal models of an active intellectual, physical and social life in humans. A variety of studies have demonstrated that EE induces beneficial effects on regulatory systems, slowing down the rate of aging and extending life span. In addition, the positive action of balneotherapy on health has been long known, especially in elderly. Thus, hydrotherapy may be postulated as a new kind of EE strategy, reversing the age-related behavioral and immune declines and extending life expectancy, as EE with objects does. Moreover, knowing the beneficial properties of mineral-medicinal waters on health, using this kind of water in a hydrotherapy intervention may enhance the positive effects of this strategy on the regulatory systems function in aging. Apart from the EE strategies mentioned above, there are diverse life style interventions capable to control or even reverse the deleterious effects of aging on the organism and consequently on life span. In this context, some interventions, of different nature from the more commonly studied, may exert positive effects on the regulatory systems in aging and hence, on health in the last stages of life.

Taking all of this into account, the objectives of the present Thesis were:

**1<sup>st</sup> objective:** to deepen and to approach the immunosenesce process in chronological aging in mice, carrying out longitudinal studies to analyze how the T cells membrane elasticity is modified with age and to determine if there is a relation between this parameter and the life span of the individual, as well as to analyze the changes in the secreted and intracellular levels of pro and anti-

inflammatory and regulatory cytokines by peritoneal leukocytes cultured in basal or mitogen-stimulated conditions throughout life span.

**2<sup>nd</sup> objective:** to deepen the stress hyperactivity and anxiety responses in adult Prematurely Aging Mice (PAM) as well as to study how is affected the secretion of pro and anti-inflammatory and regulatory cytokines by peritoneal leukocytes cultured in basal or mitogen-stimulated conditions in adult PAM with respect to NPAM of the same chronological age.

**3<sup>rd</sup> objective:** to study the effects of social isolation and anxiety on the nervous and immune system function as well as on life span in different life stages (postnatal period, adulthood and elderly) in rats and mice models.

**4<sup>th</sup> objective:** to deepen in the effect of EE using objects to ameliorate the behavior and the function and oxidative stress of peritoneal leukocytes as well as to extend life span in chronological old mice and adult PAM. To determine if hydrotherapy using tap water may be proposed as a new type of EE strategy capable to revert the regulatory system age-related decline as well as to extend life expectancy in chronological and accelerated aging. To study the effect of mineral-medicinal waters applied by hydrotherapy to enhance the beneficial actions of this strategy on the activity of the nervous and immune systems in old and mature mice.

**5<sup>th</sup> objective:** to apply diverse strategies, of different nature from the most commonly studied interventions in aging, in order to analyze their possible positive effects on the behavior and the function and oxidative stress of peritoneal leukocytes as well as on the life span of chronologically old mice. These strategies are: drinking mineral-medicinal water, a Nutrisim® treatment (a natural compound with anti-inflammatory actions previously reported), a chronic treatment with the  $\beta$ 1-blocker drug atenolol and the application of an electric nanopulses therapy.

The **results** and **conclusions** obtained from the 1<sup>st</sup> objective indicate that the membrane T cell elastic modulus E (a parameter to measure elasticity) did not modify with age as well as there is no relation between the value of this parameter in adulthood and the life span of the individual. By contrast, with advancing age, the cytokine network experiences profound changes in mice. Thus, with age, leukocytes increase the secretion of some pro-inflammatory cytokines, particularly IL1 $\beta$  and IL6, as well as reducing the liberation of the anti-inflammatory cytokine IL10 in basal conditions. Moreover, the intracellular content of these immune mediators in leukocytes also change in aging, with a higher intracellular concentration of the pro-inflammatory IL6 and of the anti-inflammatory IL10. These results confirm the key role of immune cells in the establishment and maintenance of a sterile chronic and low-grade inflammation underlying the aging process, which contributes to the immunosenescence due to the increase in inflammatory compounds accompanied by the decrease in anti-inflammatory defenses in absence of any antigen or *stimulus* in immune cells. Additionally, with advancing age, leukocytes release and contain lower concentrations of pro and anti-inflammatory as well as regulatory cytokines in response to the mitogens LPS y ConA (which mimic the *in vivo* action of antigens). These data corroborate the

incapacity of aged immune cells to initiate an adequate immune response. With regards the 2<sup>nd</sup> objective, the results indicate that adult PAM show higher voluntary physical activity and burying behavior as well as a nest building deterioration with respect to adult NPAM. These results confirm the stress hyperreactivity and the high anxiety levels previously observed in PAM, which are characteristic of chronologically old mice. Likewise, since adulthood, peritoneal leukocytes cultured in resting conditions from PAM exhibit a sterile inflammation, since these cells release higher amounts of pro-inflammatory and IL17 cytokines as well as lower levels of the anti-inflammatory cytokine IL10, with respect to NPAM and similarly to old mice. Moreover, this inflammation observed in resting state, may contribute to the premature immunosenescence characteristic in PAM, which is confirmed in the results of this objective where the leukocytes from PAM release lower concentrations of cytokines in response to the mitogens LPS y ConA compared to NPAM and, again, as it was observed in aging. All these results corroborate that PAM conform a natural model of premature aging. The results obtained from the 3<sup>rd</sup> objective point out that the pups separated from their dam 3 h daily during lactancy show, in adult age, suffer a potent psychological stress with long-term effects on immunity, particularly on adaptive immunity. Thus, in adult age, splenic and thymic leukocytes from maternally separated rats show an impaired proliferative capacity. Besides, suffering social isolation, and specially confronting and responding to that stress with high anxiety levels, as well as being anxious (without facing any psychological stress) aggravate the functional and oxidative stress age-related deterioration in leukocytes from old rats and mice, showing these animals an accelerated aging process. This accelerated aging reflects on the shorter life span shown in the old mice. In addition, exposure to social isolation in adulthood, especially in more anxious mice, or showing high anxiety levels without suffering any psychological stress also induce an impairment of behavior and immunity, without modifying life span. Therefore, suffering psychosocial stress in different life stages may accelerate aging in rodents, increasing morbidity and mortality. With respect to the 4<sup>th</sup> objective, the results indicate that both old mice and adult PAM exposed to EE using objects, even during short time, show a remarkable improvement in some behavioral and function and redox state of peritoneal leukocyte parameters. Moreover, PAM exposed to this type of EE live longer than non-enriched PAM, showing a similar longevity than NPAM. Similarly, tap water hydrotherapy improves behavior and immunity in a similar way that EE using objects does, both in old mice and in socially isolated old mice, extending life span in these animals. Those beneficial effects of hydrotherapy are enhanced using sulphur-enriched mineral-medicinal water. Taking all of this into account, EE using objects is confirmed as an effective strategy to reduce the biological age as well as to extend life span when the individual is exposed to an enriched environment since adulthood. Moreover, given the similar effects on regulatory systems function between this type of EE and hydrotherapy, the last intervention may be considered as a new type of EE to improve life quality and to extend life expectancy. And these positive effects of hydrotherapy are enhanced by using sulphur-enriched mineral-medicinal water. Finally, the results obtained in the 5<sup>th</sup> objective indicate that drinking Sulphur-enriched mineral-medicinal water improves some capacities of innate immunity in mature mice. In addition, the administration of Nutrisim©, particularly after 4 weeks of treatment, reverts the behavioral and immune age-related decline as well

## ***Abstract***

---

as reduces the oxidative stress of leukocytes in old mice. A chronic treatment with atenolol as well as a short-term therapy applying nanopulses improves immune function in elderly. Thus, the interventions applied in this 5<sup>th</sup> objective may be considered as potencial strategies capable to ameliorate and even to revert the age-related decline of the regulatory systems and hence to achieve a healthy longevity.

**Keywords:** Aging, Neuroimmunology, Social Isolation, Anxiety, Anti-Aging Strategies.





# Introducción



### 1.1. EL ENVEJECIMIENTO

#### 1.1.1. Definición del envejecimiento y sus características. La longevidad.

El envejecimiento podría definirse como el conjunto de cambios que afectan a todas nuestras células y tejidos al avanzar la edad, llevando a una pérdida progresiva de nuestras capacidades fisiológicas así como a una incapacidad para mantener la homeostasis, o más correctamente la **homeocinesis**. Con respecto a este último concepto, cabe comentar que si bien se ha denominado tradicionalmente como homeostasis a la capacidad corporal de responder, interactuar y adaptarse a los cambios externos e internos, no se trata de un equilibrio estático lo que alcanza el organismo, el cual, por otra parte, sería incompatible con la vida. Por ello, Yates (1994) introdujo el término *homeodynamics* u homeocinesis, cuyo uso ha ido incrementándose desde entonces. El concepto de homeocinesis o equilibrio homeocinético tiene en cuenta que el medio interno no es fijo, sino que todos los niveles de organización del organismo interaccionarían y se regularían de forma dinámica, constituyendo un término que se ajusta mejor a la realidad que el de homeostasis utilizado tradicionalmente (Rattan, 2006).

Se ha de tener en cuenta de que, a pesar de que el envejecimiento supone un deterioro progresivo y generalizado de las funciones del organismo, se trata de un proceso fisiológico y no patológico. Aunque la pérdida de capacidad para alcanzar el equilibrio homeocinético que sucede al envejecer supone una predisposición a la pérdida de la salud y el aumento de morbilidad y mortalidad, el envejecimiento debe ser entendido como un proceso natural. Todos envejecemos, es un hecho inevitable que se inicia al completar el desarrollo del individuo, en la edad adulta, y termina con la muerte del mismo. De este modo, la mayor parte de nuestra vida nos la pasamos envejeciendo, ya que en el ser humano se inicia el proceso de envejecimiento a los 20 años y tenemos una esperanza de vida media o longevidad media, al menos en nuestro país, de casi 83 años. Además, y de forma particular en las sociedades “desarrolladas”, los avances en los ámbitos sanitario y social están promoviendo una mejora de la calidad de vida de los individuos, lo que favorece el aumento de esa longevidad media (media de años de vida de una determinada población que ha nacido en la misma fecha), que a diferencia de la máxima, puede ser modificada por el estilo de vida (De la Fuente y Miquel, 2009). Todo ello, y dado el actual aumento del porcentaje de personas mayores en la sociedad, en

las últimas décadas ha surgido un creciente interés por el estudio del envejecimiento, no sólo con el fin de conocer mejor y entender los mecanismos que subyacen a este proceso sino también para conocer cómo se puede conseguir una longevidad saludable.

Ya en el año 1977, Strehler indicó las cuatro reglas que caracterizan el envejecimiento. Se trata de un proceso **universal** (tiene lugar en todos los individuos), **intrínseco** o **endógeno** (sus causas tienen un origen interno), **progresivo** (la tasa o velocidad a la que se producen los cambios es similar a lo largo de todo el proceso) y **deletéreo** (es claramente perjudicial para el individuo, no así para la especie).

### 1.1.2. El concepto de edad biológica y longevidad

Más allá de estas reglas anteriormente mencionadas, el envejecimiento también se caracteriza por su gran heterogeneidad. Ésta radica en que no todos los cambios que suceden en los sistemas de un organismo se producen a la misma velocidad, así como tampoco lo hacen los individuos con una misma edad cronológica. Por tanto, es evidente que el “tiempo biológico” que se manifiesta en los individuos no tiene por qué coincidir con el “tiempo cronológico”, no tienen lugar al mismo ritmo. En base a este hecho, surge el concepto de “**edad biológica**”, considerado un mejor indicador de la velocidad a la que envejece un individuo que la edad cronológica y siendo, por tanto, determinante de su esperanza de vida. Por ello, la edad biológica y la esperanza de vida o longevidad medias estarían íntimamente relacionadas, de manera que los individuos de una población de igual edad cronológica que estuviesen más envejecidos, mostrarán una mayor edad biológica y, por tanto, vivirán menos. Para determinar la edad biológica es necesaria la utilización de marcadores biológicos o “biomarcadores”, los cuales son parámetros psicológicos, fisiológicos y bioquímicos que sufren modificaciones con la edad y, que tras ser sometidos a los análisis estadísticos pertinentes, puedan evidenciar la existencia de una relación entre la edad biológica, la edad cronológica, la pérdida de salud y la longevidad. A pesar de los esfuerzos de los gerontólogos en la búsqueda de estos biomarcadores desde hace años hasta la actualidad (Furukawa *et al.*, 1975; Borkan y Norris, 1980; Soler *et al.*, 1992; Bae *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2010; Zhang W-G *et al.*, 2014, Belsky *et al.*, 2015), aún no existe un consenso sobre qué marcadores son los adecuados para establecer la edad biológica, constituyendo uno de los objetivos a batir en el campo de la gerontología. Además, muchos de los estudios realizados no incluyen

parámetros inmunitarios, que se consideran relevantes y muy representativos de la edad biológica de un individuo, habiéndose demostrado la existencia de una relación directa entre una apropiada función inmunitaria y la longevidad (Ferguson *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 1997; Guayerbas *et al.*, 2002a; De la Fuente, 2008a; De la Fuente y Miquel, 2009; Arranz *et al.*, 2010a; 2010b; De la Fuente, 2014a). En este sentido, nuestro grupo de investigación ya ha aportado evidencias de que la determinación de la edad biológica es posible a través de la valoración de una serie de parámetros inmunitarios (De la Fuente, 2014b; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

Por su parte, el proceso de envejecimiento culmina al final de la esperanza de vida máxima o **longevidad máxima**, que se podrían definir como el tiempo máximo que vive un individuo perteneciente a una determinada especie. En el caso del ser humano, dicha longevidad máxima se encontraría en los 120 años mientras que en el caso del ratón ésta sería de unos 3 años. A diferencia de la **longevidad media**, la longevidad máxima es específica de la especie a la que el individuo pertenece y se trata de un valor fijo, determinado genéticamente. Por el contrario, la longevidad media, como antes se ha mencionado, estaría altamente influenciada por el estilo de vida y diversos factores ambientales. Como el aumento en la longevidad media depende de la capacidad de cada individuo de mantener la salud, y se ha propuesto que en esto los genes pueden contribuir en un 25%, pero el ambiente y el estilo de vida en un 75%, esos porcentajes pueden aplicarse a la consecución de la esperanza de vida media. Hay que tener presente que los genes (genoma) y el ambiente (ambioma) van a incidir en cada individuo desde la vida fetal, tras el nacimiento y desarrollo hasta la edad adulta (determinando en qué estado se llegue a esa edad), y posteriormente en el largo proceso de envejecimiento (Kirkwood, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009).

### **1.1.3. ¿Cómo, dónde y por qué envejecemos? Teorías del envejecimiento.**

Dada la gran complejidad de los cambios que suceden durante el proceso de envejecimiento, existen numerosas teorías que intentan dar respuesta a estas tres preguntas básicas: ¿cómo se produce el envejecimiento?, ¿dónde se inicia y se desarrolla? y ¿por qué tiene lugar?. En el año 1990, Medvedev recopiló más de 300 teorías que se habrían propuesto hasta la fecha para explicar el proceso de envejecimiento. No obstante, muchas de ellas sólo se basaban en las consecuencias del mismo sobre el organismo, no en sus causas, o bien

no son aplicables a todos los niveles de organización de un organismo (molecular, celular y fisiológico).

A pesar de la gran cantidad de teorías del envejecimiento, éstas se pueden agrupar en dos grandes apartados o bloques: las “**Teorías deterministas**” y las “**Teorías estocásticas**” o “**epigenéticas**”.

Las teorías “**deterministas**” responsabilizan del envejecimiento a los genes siendo éste, por tanto, un proceso programado genéticamente. Dentro de este grupo de teorías, caben destacar: la teoría del “**límite mitótico**” de Hayflick (1965), según la cual las células con cada división perderían capacidad mitótica, equivaliendo esta pérdida al envejecimiento celular; y la teoría del “**acortamiento de los telómeros**” (Olovnikov, 1973; Harley *et al.*, 1990), en la que se propone que el acortamiento de los extremos de los cromosomas que se produce en cada división celular estaría relacionado con la tasa de envejecimiento, produciéndose el fin de la división celular cuando se alcanza el acortamiento total de los telómeros. No obstante, ambas teorías explicarían una consecuencia del envejecimiento, la senescencia celular replicativa, y no su origen. Además, sólo podrían aplicarse a células con capacidad de división, no explicando el proceso de senescencia en las células de escasa o nula proliferación, las denominadas post-mitóticas, como la mayoría de las neuronas (Goyns, 2002). Así mismo, respecto a la última teoría comentada, si bien se ha determinado que existe una relación entre el acortamiento de los telómeros y el envejecimiento y la longevidad (Blasco, 2007; Boonekamp *et al.*, 2013), algunos autores han propuesto que dicho acortamiento se vería acelerado por el daño oxidativo e inflamatorio que sucede durante el envejecimiento (von Zglinicki y Martin-Ruiz, 2005). De hecho, en el año 2007, Hayflick se retractó de su anterior teoría, indicando que el envejecimiento se trata de un proceso estocástico en el que se dan una serie de cambios o alteraciones moleculares una vez el animal ha alcanzado su madurez reproductora. No obstante, si bien las teorías “deterministas” no parecen ser capaces de responder de forma satisfactoria a las preguntas planteadas, se han propuesto una serie de genes, los denominados “gerontogenes”, que parecen tener, si bien de forma indirecta, cierta influencia sobre la longevidad (Johnson y Lithgow, 1992; Rattan, 1995).

En cuanto a las teorías “**estocásticas**” o “**epigenéticas**”, éstas también otorgan cierto papel participativo a los genes en el proceso de envejecimiento, sin olvidar la importante influencia en este proceso de los factores ambientales. Este grupo de teorías propone que el

envejecimiento se produciría por el acúmulo progresivo y al azar de daños irreversibles. Entre todas las teorías “estocásticas” o “epigenéticas”, cabe destacar la teoría de la **“oxidación o de los radicales libres”**, propuesta por Harman en 1956, siendo muy ampliamente aceptada por los gerontólogos en la actualidad. Esta teoría, que fue posteriormente perfilada por otros investigadores (Miquel *et al.*, 1980; Miquel, 1998; Pamplona y Barja, 2003; Barja, 2004), tiene como concepto fundamental que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daño a biomoléculas causado por los radicales libres (átomo o molécula que contienen uno o más electrones desapareados) que se producen en la inevitable utilización del oxígeno por nuestras células. Estos radicales, o mejor utilizando el término más amplio de “especies reactivas de oxígeno” (ROS, del inglés *radical oxygen species*) esto es, todas las moléculas derivadas del oxígeno que contienen grupos reactivos aunque no se acojan a la definición indicada para un radical libre, se producen continuamente y pueden oxidar a todas las biomoléculas del organismo, deteriorándolas y con ello la capacidad funcional del mismo (**Figura 1**). Además de las ROS, ha de mencionarse la existencia de las especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*); así, la generación de óxido nítrico por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa es clave para muchos procesos fisiológicos pero también una fuente importante de oxidantes, como el peroxinitrito. Así, la teoría de los radicales libres nos indica cómo se produce el proceso de envejecimiento, por oxidación.

En este punto se puede indicar que las células han desarrollado toda una serie de mecanismos antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos derivados del uso del oxígeno, previniendo no sólo la formación de ROS sino también neutralizando su excesiva formación (**Figura 1**) (Matés *et al.*, 1999; Knight, 2000; Yoon *et al.*, 2002). No obstante, a pesar de los efectos perjudiciales de los ROS, éstos son muy necesarios para muchos procesos fisiológicos como la defensa contra agentes infecciosos, la señalización intracelular y la inducción de la respuesta mitogénica. Incluso pueden proteger a las células de padecer el estrés oxidativo, participando en el restablecimiento y mantenimiento de lo que se denomina balance redox u homeostasis redox (Valko *et al.*, 2010). Por tanto, el funcionamiento de nuestro organismo se basa en el perfecto equilibrio entre los niveles de oxidantes (ROS) y de antioxidantes. La pérdida de este equilibrio, por un exceso de producción de los primeros o una menor disponibilidad de los segundos, conduciría a una situación de estrés oxidativo que

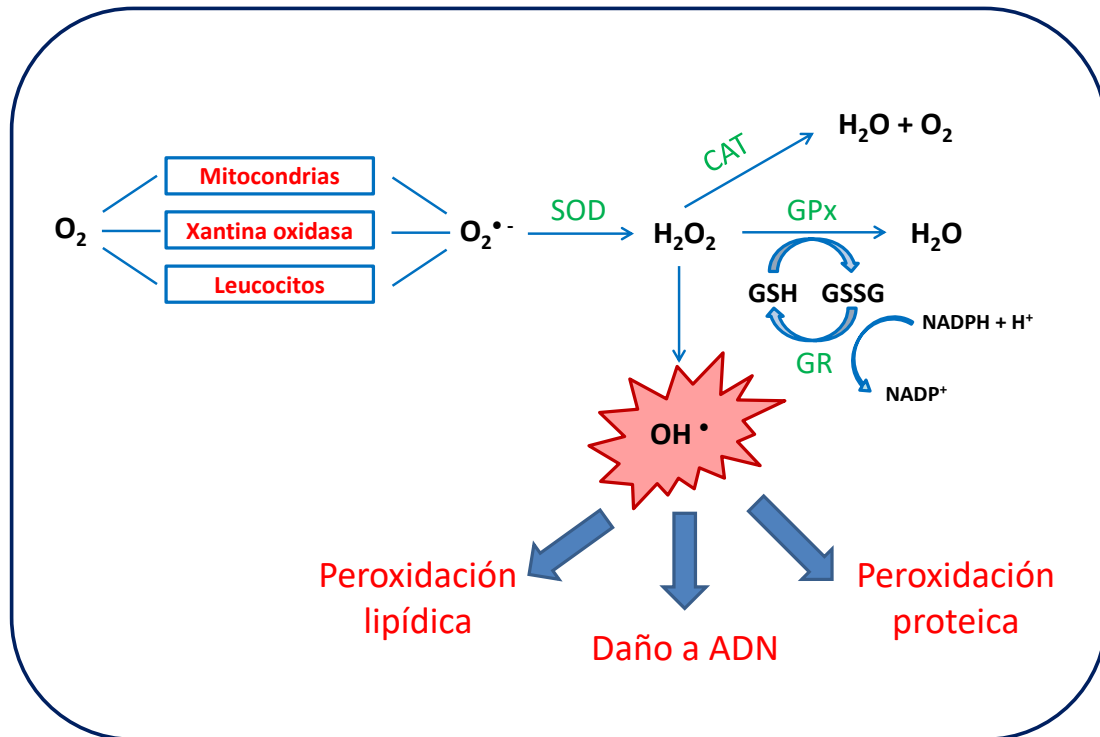


lleva finalmente al daño en las biomoléculas y a la alteración de la función celular y, consecuentemente, al envejecimiento y la aparición de enfermedades (Sies, 1986; Sastre *et al.*, 2000; Valko *et al.*, 2007; Cannizzo *et al.*, 2011, Vida *et al.*, 2014). De este modo, perfilando la respuesta a cómo se produce el envejecimiento, habría que decir que este proceso está estrechamente relacionado con la oxidación que se produce en condiciones de estrés oxidativo, en las que se da un aumento de oxidantes y una disminución de las defensas antioxidantes. Dicho estrés supondría la base de los cambios que suceden a todos los niveles de organización del individuo durante el proceso de envejecimiento.

Teniendo en cuenta que la utilización del oxígeno es imprescindible en la respiración para mantener el metabolismo celular, la mitocondria constituye la primera diana de esta oxidación, y de forma más especial en las células post-mitóticas debido a su escasa capacidad para regenerar sus orgánulos. Este hecho permitió desarrollar la teoría “**mitocondrial del envejecimiento**”, basándose en la teoría de Harman anteriormente citada (Harman, 1972; Miquel *et al.*, 1980; Miquel, 1998; Barja, 2002). Así, en cuanto al dónde se origina el proceso de envejecimiento, éste se iniciaría en las mitocondrias de las células diferenciadas (Miquel *et al.*, 1980).

Existiría un tercer bloque o grupo de teorías cuya finalidad es dar respuesta a por qué envejecemos. Son las “**teorías evolutivas**”. Entre ellas, cabe destacar la teoría propuesta por Williams (1957), según la cual el envejecimiento es una consecuencia de los efectos secundarios del producto de genes necesarios para alcanzar el máximo rendimiento funcional en la edad reproductora (edad adulta) y así asegurar la perpetuación de la especie, pero que resultan desventajosos después para el individuo, puesto que éste no interesa ya en términos biológicos, sino que prima el mantenimiento de la especie.

Así mismo, se sabe que existe una relación entre la oxidación y la inflamación (Sarkar y Fisher, 2006; Salminen *et al.*, 2008; Cannizzo *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2014), de manera que se produce un aumento de compuestos pro-inflamatorios al envejecer que conduce finalmente al establecimiento de un estrés inflamatorio. Es por ello que la idea de una “**inflammaging**” ha sido muy aceptada (Franceschi *et al.*, 1995,...). En base a todo ello, se propuso recientemente una nueva teoría del envejecimiento, la de la **oxidación-inflamación**, acuñando el término



**Figura 1. Vía de formación de radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno (ROS).** El envejecimiento, según la teoría de la oxidación o de los radicales libres, se produce como consecuencia del daño oxidativo a biomoléculas causado por la elevada reactividad de los radicales libres producidos principalmente por las mitocondrias, como resultado del uso inevitable del oxígeno en el metabolismo celular. Los leucocitos, mediante el estallido respiratorio, así como la xantina oxidasa pueden también contribuir al aumento de ROS. El primer radical libre que aparece en las células es el anión superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), que se transforma en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), el radical libre más reactivo, responsable de la oxidación de biomoléculas. Las células han desarrollado toda una serie de mecanismos antioxidantes para neutralizar la acción de los oxidantes (radicales libres y ROS), entre los que se encuentran la enzima superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la transformación de  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$ , y la catalasa (CAT), que transforma este último en agua y oxígeno. Además, el glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más importante que existe en el organismo para eliminar  $H_2O_2$  y otros peróxidos orgánicos a través de su oxidación por efecto de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), dando la forma oxidada (GSSG). Por su parte, la enzima glutatión reductasa (GR) devuelve al glutatión a su forma reducida.

“**oxi-inflamm-aging**” para indicar lo que sucede al envejecer (De la Fuente y Miquel, 2009). Según esta teoría el envejecimiento sería consecuencia de un estrés oxidativo crónico asociado a un estrés inflamatorio, los cuales afectarían a todas las células, pero de manera más relevante a las de los sistemas reguladores, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, por lo que se deteriora la homeocinesis y aumenta la morbilidad y mortalidad. Además, en esta teoría se propone que dadas las características del sistema inmunitario, el cual necesita producir oxidantes y compuestos inflamatorios en su función defensiva frente a patógenos y cánceres, si dicha producción no está bien regulada, a través de la activación de factores como el NF- $\kappa$ B que

luego se comentará, puede entrar en un círculo vicioso que aumente el estrés oxidativo e inflamatorio del organismo. De esta forma, se sugiere que el sistema inmunitario puede modular la velocidad de envejecimiento de cada individuo (De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente 2014).

Siguiendo este concepto y aunando con la idea evolutiva de las teorías del envejecimiento, se podría sugerir que la expresión de genotipos pro-oxidantes y pro-inflamatorios habría permitido, desde tiempos ancestrales, la supervivencia del individuo, de una especie determinada, hasta alcanzar la edad reproductora. Y dichos caracteres terminarían siendo deletéreos posteriormente en el envejecimiento (Franceschi *et al.*, 2000a; De Martinis *et al.*, 2005). De esta manera, una vez alcanzada la edad adulta, se experimentaría una “oxi-inflamm-aging” (De la Fuente y Miquel, 2009).

### **1.2. LOS SISTEMAS REGULADORES, LA COMUNICACIÓN PSICONEUROINMUNOENDOCRINA Y EL ENVEJECIMIENTO.**

La existencia de una relación íntima y recíproca entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario, también denominados sistemas reguladores, ha sido ampliamente estudiada y documentada (Blalock, 1989; Besedovsky y Del Rey, 1996). En esta comunicación bidireccional las células inmunitarias que reconocen y reaccionan frente a estímulos no cognitivos (los antígenos), informan de ello, a través de los mediadores que producen para la respuesta inmunitaria, principalmente las citoquinas, a las células de los sistemas nervioso y endocrino. A su vez, estos últimos son capaces de identificar y responder a estímulos cognitivos (como la luz, el sonido o el estrés) y transferir dicha información al sistema inmunitario mediante los neurotransmisores y hormonas que generan (Blalock, 1984). La interacción entre estos tres sistemas es posible debido a la presencia de receptores en cada uno de ellos capaces de reconocer los mediadores específicos de los otros (neurotransmisores, hormonas y citoquinas), así como a la presencia de productos de los tres sistemas en cada uno de ellos (Besedovsky y Del Rey, 2007; Besedovsky y Del Rey, 2011). Si bien en un principio la comunicación entre estos tres sistemas reguladores se denominó comunicación neuroinmunoendocrina, a partir de la década de los 70 y especialmente de la de los 80, del pasado siglo se comenzó a acuñar el término “**comunicación psiconeuroinmunoendocrina**”. Éste, más adecuado que el anterior, engloba no sólo la interacción y la influencia de los sistemas reguladores sino que introduce la participación de los pensamientos y

emociones en la comunicación de los sistemas y la consecuente respuesta conductual (Ader y Cohen, 1975; Cousins, 1989; Rabin, 1999; Besedovsky and Del Rey, 2007; Nemeroff, 2013).

Un claro ejemplo de cómo funciona la comunicación psiconeuroinmunoendocrina es el estrés, cuyos mecanismos se introducirán en más detalle en el siguiente apartado. Pero no es la única situación en la que se manifiesta la interrelación de estos sistemas. Así, se ha demostrado que lesiones cerebrales provocan alteraciones de la función inmunitaria (Roszman *et al.*, 1985) o que la presencia de determinados factores del sistema nervioso a nivel local parece ser esenciales en el desarrollo de los órganos linfoides (Ackerman *et al.*, 1987; Bulloch *et al.*, 1987). Además, alteraciones psicológicas o psiquiátricas como la depresión o la esquizofrenia se acompañan de alteraciones en el funcionamiento no sólo del sistema neuroendocrino, también del inmunitario (Lopes *et al.*, 2012; Smyth y Lawrie, 2013; Kim *et al.*, 2016). Así mismo, los grandes mediadores del sistema inmunitario, las citoquinas, tienen un efecto modulador sobre el sistema neuroendocrino, regulando la acción y secreción de diversas hormonas y neurotransmisores llegando incluso a modificar procesos sensoriales, emotivos y cognitivos (Maier y Watkins, 2003). De hecho se ha propuesto que las citoquinas participan en una gran variedad de funciones neuroendocrinas como procesos de señalización en el cerebro durante una infección (Besedovsky *et al.*, 1985; Besedovsky y Del Rey, 1996; Maier *et al.*, 2001), de dolor crónico o neuropático (Chacur *et al.*, 2001; Milligan *et al.*, 2003), cognitivos como la formación de memoria (Pugh *et al.*, 2001; Harbuz, 2003) y el mantenimiento de la plasticidad sináptica (Zhao y Schwartz, 1998; Beattie *et al.*, 2002), entre otros; sin olvidar el importante papel de las citoquinas en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis- adrenal (HHA) (Turnbull y Rivier C, 1995).

Así mismo, también existe una regulación neuroendocrina sobre el sistema inmunitario. En cuanto a los neurotransmisores, sus efectos sobre las células inmunitarias son variados y complejos, en función de la población de leucocitos sobre la que actúen así como del subtipo y afinidad de los receptores específicos para dicho neurotransmisor presente en la misma. Entre la gran variedad de neurotransmisores con capacidad para modular la función inmunitaria, se podría destacar la noradrenalina (NA), la dopamina (DA) o el neuropéptido Y (NPY) (Heijnen CJ y Kavelaars A, 1999; Elenkov *et al.*, 2000; Puerto *et al.*, 2005; Dimitrijevic y Stanojevic, 2013; Arreola *et al.*, 2016). De igual

manera, las hormonas modulan la función inmunitaria, pudiendo estimularla o inhibirla (Straub *et al.*, 2000; Csaba, 2014). Dentro de las hormonas estimuladoras se podrían incluir las hormonas tiroideas, la prolactina (PRL) o la hormona de crecimiento (GH) (Chikanza, 1999; Baeza *et al.*, 2008, 2009; Hattori, 2009; Jara *et al.*, 2017), mientras que en las segundas destacarían los glucocorticoides, de los cuales se hablará más en detalle en el siguiente apartado de esta introducción dedicado al estrés.

Por otro lado, existe un marcado dimorfismo sexual en la comunicación psiconeuroinmunoendocrina. Así, los estrógenos parecen ser los responsables de que las hembras presenten una mayor inmunocompetencia, mostrando respuestas inmunitarias más potentes que los machos (Weinstein *et al.*, 1984; Keller *et al.*, 2001; De la Fuente *et al.*, 2004a), hecho que podría subyacer en que las hembras alcanzan una mayor esperanza de vida.

El correcto funcionamiento de los sistemas reguladores así como de la comunicación entre ellos, esto es, la comunicación psiconeuroinmuno-endocrina, permitirá el mantenimiento de la homeocinesis y, por tanto, de un buen estado de salud. No obstante, cualquier estímulo o situación que afecte a esos sistemas reguladores, como ocurre en el envejecimiento, perjudicará su función y la comunicación entre ellos, con la consecuente pérdida del equilibrio homeostático que favorecerá la aparición de enfermedades.

### 1.2.1. El envejecimiento de los sistemas nervioso y endocrino

Al avanzar la edad, los sistemas nervioso y endocrino sufren una serie de cambios que conllevan una pérdida de la capacidad de responder adecuadamente a los cambios del entorno, lo que puede determinar la aparición de enfermedades.

Con respecto a los cambios asociados con la edad que suceden en el **sistema nervioso**, éste sistema regulador sufre modificaciones en todos sus niveles de organización (moleculares, celulares, anatómicos y funcionales), que incrementarían la vulnerabilidad a padecer una gran variedad de patologías, incluyendo las de tipo neurodegenerativo (Shetty *et al.*, 2011). En el envejecimiento cerebral se producen alteraciones en los niveles de toda una serie de neurotransmisores, factores neurotróficos, enzimas y metabolitos (Smith *et al.*, 2005). Así se ha descrito una disminución de los niveles de dopamina acompañado de una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la corteza

frontal y el estriado, que podría relacionarse con el declive cognitivo y motor asociados al envejecimiento (Ota *et al.*, 2006). También, la serotonina o el glutamato disminuyen con la edad (Chang *et al.*, 2009). Al igual que ocurre en todos los sistemas del organismo, en el cerebro se produce al avanzar la edad un aumento de los oxidantes, debido a un incremento de su producción, junto con una alteración de los sistemas de defensa antioxidantes (Esiri, 2007). Este estrés oxidativo crónico que afecta al sistema nervioso se asocia con los mayores niveles de ansiedad característicos de los individuos de edad avanzada (Bouayed *et al.*, 2009; Hovatta *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2014). Además, la ansiedad contribuye a la modificación de determinadas áreas cerebrales relacionadas con funciones cognitivas como la memoria o el aprendizaje y con las respuestas emocionales, como es el caso del hipocampo, el hipotálamo, la corteza frontal y el complejo amigdalino (McEwen, 2005; Mitra y Sapolsky, 2008; Roozendaal *et al.*, 2009). Por su parte, al envejecer también se modifican la expresión de algunos factores neurotróficos que participan en numerosos procesos neurológicos como la supervivencia neuronal, la arborización dendrítica o la plasticidad sináptica, destacándose entre ellos el BDNF (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*). La disminución de estos factores se asocia con los efectos negativos del envejecimiento sobre el cerebro y con las enfermedades neurodegenerativas (Adlard *et al.*, 2005; Mattson y Magnus, 2006; Mora *et al.*, 2007). Con respecto a los cambios anatómicos, cabe destacar que con la edad se produce una reducción del volumen total cerebral, que parece afectar particularmente a determinadas áreas, incluyendo la corteza frontal. Este menor volumen se debería a la reducción del número de espinas dendríticas y del número de sinapsis, así como al acortamiento de los axones mielínicos (Dickstein *et al.*, 2007), y afectaría tanto a la sustancia gris como a la sustancia blanca (Montembeault *et al.*, 2012). Pero el envejecimiento no sólo afecta a las neuronas sino también a las células gliales. Así, los astrocitos experimentan una hipertrofia además de una activación, mientras que la microglía se activa de forma exacerbada (Nichols, 1999), contribuyendo ambos procesos al deterioro de las neuronas y a la neuroinflamación que aparecen al avanzar la edad. Todas estas alteraciones anatómicas y metabólicas que suceden con el envejecimiento, tienen consecuencias funcionales de forma que los individuos de edades avanzadas muestran un declive conductual y cognitivo. De esta manera, en el envejecimiento se producen alteraciones del sueño, déficits de atención y un deterioro de procesos de memoria y aprendizaje (Hedden Y Grabieli, 2004; Kapogainnis y Mattson, 2011). En este contexto también se ha descrito

la alteración de parámetros conductuales, observándose un deterioro de las capacidades sensoriomotoras (vigor neuromuscular y la coordinación motora) (Shukitt-Hale *et al.*, 1999; Butterfield *et al.*, 2004; Serrajd y Jamon, 2007) así como un descenso de la actividad locomotora y exploratoria y de las conductas sociales, relacionadas con el aumento de ansiedad característica del envejecimiento (Belzung y Griebel, 2001; File y Seth, 2003; Francia *et al.*, 2006).

Con respecto al **sistema endocrino**, se han descrito también cambios asociados con la edad en los niveles de hormonas. Así, se han observado disminuciones en los niveles de las hormonas relacionadas con el eje GH/IF-1 (del inglés, *Insulin-like factor-1*), las hormonas sexuales o la melatonina (Makrantonaki *et al.* 2010). Uno de los sistemas afectados por el envejecimiento es el **eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)**, cuyas modificaciones estarían muy relacionadas con la inadecuada respuesta a situaciones estresantes que manifiestan los individuos de edades avanzadas (Pedersen *et al.*, 2001). Si bien existen muchos resultados contradictorios al respecto, parece que con el envejecimiento se produce un aumento de los niveles de glucocorticoides así como un deterioro del mecanismo de retroalimentación mediado por estas hormonas en el hipotálamo (Sapolsky *et al.*, 1987; Lupien *et al.*, 2001; Tizabi *et al.*, 2003; Aguilera, 2011).

### **1.2.2. El envejecimiento del sistema inmunitario: la inmunosenescencia.**

La función básica del sistema inmunitario consiste en proteger y mantener la integridad del organismo, valiéndose de su capacidad para discernir entre lo propio y extraño, eliminando lo segundo. Este sistema constituye un sistema de defensa versátil que ha evolucionado con el objetivo de proteger al individuo de los agentes infecciosos (como bacterias, virus, parásitos, hongos, etc.) y células malignas. Esta acción se produce desde el nacimiento, a través de diversos componentes como las barreras epiteliales y las células y moléculas inmunitarias, que actúan conformando una red dinámica y compleja. Además, este sistema regulador contribuye al mantenimiento de la correcta función del organismo, participando en la conservación del equilibrio homeocinético, siendo incluso considerado un excelente marcador del estado de salud (Wayne *et al.*, 1990; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Rosa *et al.*, 2006; De la Fuente 2008a; 2009; De la Fuente *et al.*, 2008). No obstante, con la edad, el sistema inmunitario sufre modificaciones que comprometen su función, produciéndose un

aumento de la susceptibilidad y severidad de procesos infecciosos así como una mayor incidencia de fenómenos autoinmunes y cáncer (Yancik y Ries, 1991; Hirokawa *et al.*, 1992). De hecho, las infecciones constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las personas de edad avanzada (Castle *et al.*, 2007). Por tanto, el deterioro que induce el envejecimiento en los sistemas fisiológicos también afecta al sistema inmunitario, que experimenta cambios cuantitativos y cualitativos en casi todos sus componentes que se recogen bajo el término **inmunosenescencia** (Perskin y Cronstein, 1992; Pawelec *et al.*, 1995). A pesar de que aún en la actualidad existen resultados contradictorios acerca de cómo el envejecimiento afecta a la respuesta inmunitaria, se sabe que casi todos los componentes del sistema inmunitario se ven afectados durante dicho proceso, tanto los celulares (monocitos/macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* y linfocitos) como los no celulares (citoquinas) del sistema inmunitario innato y adaptativo (Solana *et al.*, 1999; DelaRosa *et al.*, 2006). Además, la inmunosenescencia no ocurre en una sola dirección, de manera que el sistema inmunitario sufriría una reestructuración con el avance de la edad donde algunas funciones disminuyen, otras aumentan o bien se mantienen sin cambios (Sansoni *et al.*, 2008; De la Fuente y Miquel, 2009). Así mismo, es un proceso dinámico, continuo y complejo en el que se producen reorganizaciones y mecanismos compensatorios (Globerson y Effros, 2000).

### **1.2.2.1. Cambios en las poblaciones leucocitarias con la edad**

Una de las remodelaciones que se manifiestan con la edad en el sistema inmunitario afecta a la composición de las poblaciones de los leucocitos, tanto las pertenecientes a la inmunidad innata como a la adaptativa, siendo éste uno de los aspectos mejor estudiados de la inmunosenescencia. No obstante existe gran controversia en la literatura acerca de cómo cambian en número dichas poblaciones, lo que podría deberse no sólo a diferencias debidas a la especie, sino también a la localización o al tejido en el que se encuentran la población leucocitaria a estudiar así como a los marcadores de superficie (*cluster of differentiation*: CD) utilizados.

Un hecho que se produce conforme avanza la edad, es la tendencia hacia los progenitores mieloides en detrimento de los linfoides, perdiéndose el equilibrio entre ambos linajes (Shaw *et al.*, 2010). Esto podría explicar por qué los componentes del linaje mieloide no experimentan, en general, disminuciones en su porcentaje, lo que sí ocurre en el linfoide. De esta manera, se ha observado que los



fagocitos de sangre periférica (neutrófilos y monocitos) no parecen modificar su número al envejecer (Lord *et al.*, 2001; Schröder y Rink, 2003), aunque existen controversias a este respecto (Morrison *et al.*, 1993). Sobre el cómo varía la población de macrófagos con la edad, una de las poblaciones menos estudiadas en este contexto, no parece existir un consenso. Así se ha observado en ratones que el porcentaje de estas células no varía en animales viejos en relación a adultos (Herrero *et al.*, 2002), mientras que trabajos de nuestro grupo de investigación han demostrado una disminución con la edad de los macrófagos peritoneales (CD11b+) (Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2010c).

Con respecto a las células NK, éstas también experimentan cambios cuantitativos con la edad. Así, numerosos autores han observado un aumento en sangre periférica humana de células NK, especialmente de las encargadas de la función citotóxica (que expresan de forma tenue el marcador específico CD56) (Solana *et al.*, 1999; Solana y Mariani, 2000; Camous *et al.*, 2012). Por el contrario, en ratón, las células NK peritoneales parecen disminuir con el envejecimiento (Puerto *et al.*, 2005).

La población de los linfocitos T (CD3+) reduce su número con el envejecimiento, probablemente debido al proceso de involución que sufre el timo conforme avanza la edad (Boyd *et al.*, 2013). Sin embargo, no todas las subpoblaciones de linfocitos T manifiestan los mismos cambios. Así, los linfocitos T CD4+, también conocidos como *helper*, o bien no modifican su porcentaje o bien disminuyen en edades avanzadas, mientras que los linfocitos T CD8+ o citotóxicos, en general, parecen aumentar en número (Pawelec, 2002). Por esta razón, durante el envejecimiento se produce un descenso en la relación CD4+/CD8+ (Pawelec, 2002; Bauer y De la Fuente, 2016), aunque hay aportaciones no coincidentes (Simioni *et al.*, 2007). Además, se ha observado en estas subpoblaciones de linfocitos T un aumento de las células de memoria (CD45RO+) acompañada de una disminución en la proporción de células vírgenes (CD45RA+) al envejecer (Romanyukha y Yashin, 2003; Pawelec, 2002), probablemente debido a la estimulación antigénica crónica que sucede a lo largo de la vida (Franceschi *et al.*, 2000b). También se ha observado una pérdida de la expresión del marcador CD28, clave para la activación de los linfocitos T, habiéndose observado que los linfocitos T CD4+CD28- y CD8+CD28- constituyen una subpoblación secretora de compuestos inflamatorios, lo que contribuiría al estrés inflamatorio que sucede en el envejecimiento (Zanni *et al.*, 2003). Por su parte, en los últimos años

numerosos estudios se están centrando en conocer cómo se modifican los porcentajes de otras subpoblaciones de células T como las Th17, las reguladoras Th9 y Th22, la Tr1 (TGF $\beta$ ) o Tr3 (IL10), entre otras, las cuales, si bien menos conocidas, tendrían un creciente papel en la respuesta inmunitaria (Aw *et al.*, 2007; Annunziato y Romagnani, 2009; Noelle y Nowak, 2010).

En cuanto a los linfocitos B y sus precursores medulares, los mismos parecen disminuir con la edad a pesar de que la médula no experimenta involución como el timo (Frasca *et al.*, 2008). Asimismo, se ha observado que los precursores pre-B padecen alteraciones en su maduración en la médula y una mayor susceptibilidad a procesos apoptóticos (Allman y Miller, 2005). En este punto, cabe decir que la mayoría de los estudios se focalizan en la subpoblación de linfocitos B “convencional” o B2 si bien se conoce la existencia en determinadas localizaciones, como la cavidad peritoneal, de una subpoblación de linfocitos B denominados B1 (CD5+), con características peculiares como la capacidad de autorrenovarse y de no realizar cambio de isotipo secretando IgM. A pesar de que estos linfocitos B1 se conocen desde hace años, poco se sabe sobre su papel en el envejecimiento habiéndose observado una expansión de esta subpoblación con la edad (Stall *et al.*, 1988). Además, al envejecer parece darse un aumento de los porcentajes de células plasmáticas productoras de anticuerpos, especialmente de los CD5+, lo que se relacionaría con la mayor probabilidad de generar autoanticuerpos en edades avanzadas (Weksler, 2000). En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos B de memoria y vírgenes, se han descrito que éstas también varían en la sangre periférica de ancianos de forma similar a la indicada para los otros linfocitos (Colonna-Romano *et al.*, 2006).

### 1.2.2.2. Cambios funcionales en el sistema inmunitario con la edad

El conjunto de cambios que experimenta el sistema inmunitario con el envejecimiento o inmunosenescencia, se aprecia de forma más notable en la función de sus células, las cuales pueden no modificarse, disminuir o aumentar al avanzar la edad.

Llegados a este punto, se hace necesario comentar que existen gran cantidad de **resultados contradictorios** a lo largo de la literatura científica, especialmente en cuanto a la respuesta inmunitaria innata, lo que lleva a discusiones confusas y conclusiones erróneas. Las razones que subyacen a estas contradicciones son variadas, debido a la gran cantidad de factores que pueden modular la función de los

leucocitos y que no suelen tenerse en consideración, y que se comentarán brevemente a continuación.

Con respecto a los individuos objeto del estudio y centrándose en los animales de experimentación (ratones y ratas, fundamentalmente), uno de los problemas que surgen radica en la elección de las edades que se van a estudiar comparativamente. Así, no parece existir un verdadero acuerdo acerca de cuándo un animal puede denominarse joven, adulto, maduro, viejo o muy viejo. Esta heterogeneidad en los rangos de edad empleados y en la denominación de los mismos supondría una importante fuente de por qué existe una gran disparidad de resultados en cuanto a cómo varían las funciones inmunitarias con la edad. Otra de las fuentes de controversia se basa en la especie y la cepa de la misma que se va a estudiar. No sólo existen diferencias en la evolución con la edad de determinados parámetros inmunitarios entre ratas y ratones (Ortega *et al.*, 2000a; De la fuente *et al.*, 2004b) sino que, en el caso de los ratones de experimentación, se sabe que éstas también se producen entre cepas tan utilizadas como son los ICR-CD1 y BALB/c (Ortega *et al.*, 2000a; Guayerbas *et al.*, 2003). Así mismo, la localización de la que proceden los leucocitos puede ser otro factor importante en la disparidad de resultados existente, de manera que los procesos de inmunosenescencia no parecen suceder de manera similar en las células inmunitarias procedentes de sangre periférica, órganos linfoides o peritoneo (Ferrández *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2000a; Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas *et al.*, 2003). Por su parte, las diferencias sexuales también modulan la función inmunitaria y las mismas deben ser consideradas. De esta manera, los estrógenos femeninos ejercerían un papel antioxidante que se traduciría en una respuesta inmunitaria más potente y preservada en las hembras en la edad adulta (De la Fuente *et al.*, 2004a) así como una mayor longevidad con respecto a los machos (Borras *et al.*, 2007). Así mismo, otros factores que atañen al individuo como pueden ser su estado psicológico o nutricional también deberían tenerse en cuenta, dada su influencia en la funcionalidad del sistema inmunitario (Pawelec *et al.*, 1995; Krause *et al.*, 1999).

Los ciclos biológicos circadianos y anuales que experimentan todos las células y sistemas del organismo, suponen otro importante factor modulador de la función de los sistemas reguladores, incluyéndose el sistema inmunitario, y se ven modificados por la edad (Terron *et al.*, 2004; Esquifino *et al.*, 2007; Mate *et al.*, 2014). Este hecho pone de manifiesto la importancia de seleccionar e indicar la

hora del día así como el momento del año en que se realizan la determinación o determinaciones correspondientes.

Finalmente, los diseños y la metodología empleados también pueden considerarse una fuente de controversia en los resultados obtenidos. En este sentido, los estudios de un parámetro inmunitario en concreto realizados *in vitro*, con células aisladas de su medio natural, pueden arrojar resultados totalmente diferentes de los realizados *ex vivo*, en los que no se interrumpe la comunicación entre los distintos tipos celulares, acercándose más a lo que ocurre *in vivo* (Ortega *et al.*, 2000a; Guayerbas *et al.*, 2003; De la Fuente *et al.*, 2004b; De la Fuente y Medina, 2005).

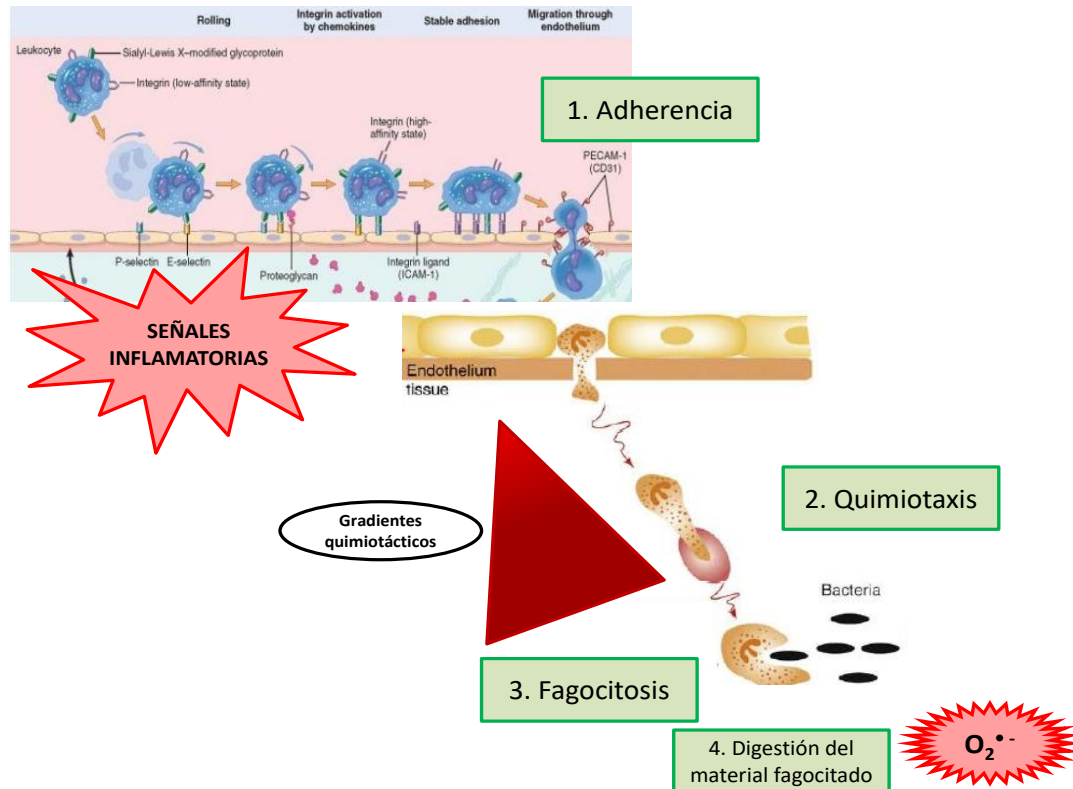
### ***La inmunidad innata***

El sistema inmunitario innato que lleva a cabo la inmunidad inespecífica proporciona al organismo una protección directa frente a agentes extraños así como es esencial para el correcto desarrollo de la inmunidad específica del sistema inmunitario adaptativo (Pawelec *et al.*, 1998). Si bien se pensó que sus componentes desempeñaban un papel minoritario en la inmunosenescencia, en las últimas décadas numerosas evidencias científicas demuestran el importante impacto del envejecimiento sobre esta rama del sistema inmunitario (Shaw *et al.*, 2010; Hajishengallis, 2010).

Las células fagocíticas como los monocitos/macrófagos y los neutrófilos realizan una serie de funciones siguiendo una determinada secuencias: adherencia, quimiotaxis, fagocitosis y digestión del material fagocitado, que se engloban en lo que se conoce como proceso fagocítico (**Figura 2**). Siguiendo este mecanismo, el sistema inmunitario elimina la mayor parte de los patógenos extracelulares (Ginaldi *et al.*, 1999). En las zonas de inflamación, se liberan gran cantidad de señales inflamatorias por parte de las bacterias y del hospedador que estimulan a las células endoteliales cercanas a dicho foco de inflamación. Gracias a receptores de superficie, como las selectinas expuestas en las células endoteliales, los fagocitos circulantes reconocen dichas señales que se generan desde el foco infeccioso, inician el rodamiento sobre el endotelio y la posterior adherencia al mismo para finalmente, extravasar la barrera endotelial. Una vez realizado este proceso, las células inmunitarias migran a través del gradiente quimiotáctico (quimiotaxis) hasta llegar al foco de inflamación donde ingieren al patógeno (fagocitosis) y lo eliminan

(digestión) mediante la producción de ROS, liberándose en primera instancia el anión superóxido (Panda *et al.*, 2009; Dalboni *et al.*, 2013).

Con el envejecimiento se han descrito toda una serie de cambios que afectan al proceso fagocítico y que se comentarán brevemente a continuación.



**Figura 2. Ilustración del proceso fagocítico llevado a cabo por los fagocitos.** Este proceso secuencial incluye la adherencia de las células al endotelio vascular y su extravasación, la quimiotaxis o movilidad de las mismas hacia el foco de infección siguiendo gradientes quimiotácticos, la fagocitosis y la digestión del material fagocitado. (Modificado de Panda *et al.*, 2009).

En cuanto a la primera función que encontramos dentro del proceso fagocítico, la **adherencia**, se hallan resultados controvertidos acerca de cómo se ve afectado este proceso con el envejecimiento. Si bien varios estudios apuntan que los macrófagos peritoneales de ratón aumentan su capacidad de adhesión al envejecer (De la Fuente *et al.*, 2000; 2001), otros no observaron cambios en esta función (Ortega *et al.*, 2000a; 2000b). Además, los macrófagos constituyen una población muy heterogénea, tanto funcional como fenotípica, que parece basarse en su capacidad para adaptarse a los cambios que suceden en el microambiente que les rodea. En este sentido, se ha propuesto que las alteraciones que experimentan los macrófagos con la edad son la consecuencia de esas adaptaciones al ambiente tisular que les rodea (Stout y Suttles, 2005). Esta puede ser una razón de por qué el

envejecimiento influye de forma diferente a los macrófagos en función de la localización del que procedan (Kohut *et al.*, 2004). Con respecto a los neutrófilos, la población de fagocitos más ampliamente estudiada, también existe gran controversia en los resultados obtenidos. Varios autores, incluyendo a nuestro grupo de investigación, han observado que con el envejecimiento los neutrófilos de sangre periférica humana aumentan su capacidad de adherencia tanto en ausencia como en presencia de estímulos como el péptido formilado (fMLP) o el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Damtew *et al.*, 1990; De la Fuente *et al.*, 2008a; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Mate I, 2015). No obstante, variando el estímulo o el sustrato usado para permitir la adhesión de los neutrófilos los resultados son contradictorios. Así, se ha observado que los neutrófilos de personas de edad avanzada muestran una mayor adherencia a la fibronectina tanto en ausencia como en presencia de TNF $\alpha$  con respecto a la mostrada en individuos jóvenes, mientras que frente a la laminina ese aumento de la capacidad de adhesión con la edad no se observa (Tortorella *et al.*, 2000). Así mismo, algunos autores no han apreciado cambios en este parámetro con la edad frente al fibrinógeno pero sí han detectado una menor capacidad adherente en los neutrófilos de personas mayores con respecto a jóvenes (Perskin y Cronstein, 1992).

El siguiente paso en el proceso fagocítico, una vez extravasado el fagocito el endotelio vascular, es la **quimiotaxis**. En este proceso, la célula se dirige hacia el foco de inflamación guiado por señales quimioatrayentes, infiltrándose en el tejido que corresponda. En general, es ampliamente aceptado que con el envejecimiento los fagocitos, tanto macrófagos de diferentes localizaciones de rata y ratón (bazo, timo, nódulos axilares y peritoneo) como neutrófilos de sangre circulante humana, experimentan una reducción de su capacidad quimiotáctica ante diversos agentes quimioatrayentes como fMLP, GM-CSF o zimosan (Niwa *et al.*, 1989; Di Lorenzo *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; 2004b; Fulop *et al.*, 2004; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; Mate, 2015).

Una vez alcanzado el punto de inflamación, los fagocitos fagocitan el material extraño. Al igual que ocurre con la quimiotaxis, en general la **fagocitosis** disminuye con el envejecimiento, lo cual se ha observado tanto en monocitos y macrófagos de diversas localizaciones tisulares (bazo, timo, nódulos axilares y peritoneo) de distintas cepas de rata y ratón, como en neutrófilos circulantes (De la Fuente, 1985; Butcher *et al.*, 2001; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Alonso-

Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; Simell *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Mate, 2015; Martínez De Toda *et al.*, 2016). Aunque también existen resultados, los menos, que apuntan a que no existen diferencias en este parámetro al envejecer (Niwa *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1999).

Habiéndose fagocitado el patógeno, el último paso consiste en su eliminación. Ésta se realiza en el interior del fagocito a través de una serie de reacciones bioquímicas que desencadenan la **respuesta microbica**, produciéndose ROS y liberándose enzimas líticas. En el proceso de generación de ROS, conocido como estallido respiratorio u oxidativo, el anión superóxido es el primer ROS que se genera debido a la reducción de una molécula de oxígeno por acción del sistema enzimático de la NADPH oxidasa. En cuanto a los macrófagos, y más concretamente los peritoneales, nuestro grupo de investigación ha obtenido una menor producción de anión superóxido intracelular en ratones viejos (De la Fuente *et al.*, 2000; 2001), no obstante existen resultados contradictorios a este respecto (Ortega *et al.*, 2000a; 2000b). En cuanto a los neutrófilos, en general parecen perder capacidad bactericida conforme avanza la edad, consecuencia de la menor capacidad de producir ROS (Walrand *et al.*, 2006; Simell *et al.*, 2011), aunque existen controversias. Así, si bien algunos autores han observado que los neutrófilos de personas de edad avanzada producen menos anión superóxido que los de individuos jóvenes al ser estimulados con diversos estímulos (Perskin y Cronstein, 1992; Biasi *et al.*, 1996; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 2000; Tsukamoto y Machida, 2012), otros han obtenido un ligero aumento (Butcher *et al.*, 2001) o bien ningún cambio en los niveles de dicho radical libre (Niwa *et al.*, 1989; Krause *et al.*, 1999; Mate, 2015).

Las **células natural killer (NK)** son células de la inmunidad innata que se generan a partir de los mismos precursores que los linfocitos T, si bien no completan su proceso de maduración en el timo (Galy *et al.*, 1995). Estas células NK conforman una población de linfocitos granulares que no expresan en superficie ni TCR ni CD3. Ambas características les permite diferenciarse de los linfocito T y las células NKT (Solana y Mariani, 2000; Mocchegiani y Malavolta, 2004). La función principal de las células NK es su **actividad citotóxica**, capaz de reconocer y eliminar células infectadas por virus y cancerígenas. Las modificaciones en dicha función de las NK con el envejecimiento han sido largamente estudiadas ya que dicho deterioro funcional está íntimamente relacionado con el aumento de la incidencia de

enfermedades infecciosas y, especialmente, de procesos neoplásicos que se da conforme avanza la edad (Albright *et al.*, 2004; Le Garff-Tavernier *et al.*, 2010). De hecho, la senescencia de la actividad de estas células está relacionada de forma directa con la mortalidad de individuos de edad avanzada, tanto en roedores como en humanos (Bruunsgaard *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001; Mocchegiani *et al.*, 2003; Aw *et al.*, 2007). En general, el envejecimiento induce una disminución de la actividad citotóxica de las células NK, tanto de las procedentes de diversas localizaciones en roedores (bazo, timo, nódulos axilares y peritoneo) (Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Puerto *et al.*, 2005) como de sangre periférica en humano (Di Lorenzo *et al.*, 1999; Mocchegiani y Malavolta, 2004; Arranz *et al.*, 2008; 2010a; De la Fuente *et al.*, 2008a; Mate, 2015). No obstante, existen autores que no han observado cambios en esta función al envejecer (Krishnaraj, 1997; Kutza y Murasko, 1994; 1996; Krause *et al.*, 1999). Las causas de la disminución de la actividad citotóxica de las células NK, generalmente aceptada, son aún poco conocidas de manera que no parece que con la edad varíe ni la unión célula efectora-célula diana, ni el contenido, la distribución y el uso de las perforinas (Mariani *et al.*, 1996). Algunos de los mecanismos subyacentes a esta pérdida de función de las células NK podrían ser ligeras modificaciones de marcadores de superficie que parecen sufrir estas células al envejecer (Aw *et al.*, 2007) así como cambios que afectan a las citoquinas durante el envejecimiento, que se comentarán más adelante, y que son importantes moduladoras de la actividad de estas células, como la IL2.

### ***La inmunidad adaptativa***

El sistema inmunitario adaptativo o adquirido o específico, está constituido por los linfocitos B y T. Esta inmunidad se caracteriza por reconocer de forma altamente específica a los antígenos así como por poseer “memoria inmunitaria”, de manera que en un segundo o posterior encuentro con un determinado antígeno se genera una respuesta mucho más rápida y robusta que en la del primero. Así, existen linfocitos vírgenes o *naïve* y linfocitos de memoria.

Se han descrito numerosas causas que originan la alteración de la inmunidad adaptativa asociada al envejecimiento. En cuanto a los linfocitos T, una de las principales causas sería el proceso de involución o atrofia tímica (Lynch *et al.*, 2009), lugar donde ocurre la maduración de estos linfocitos. De este modo, al avanzar la edad disminuye la eficacia del desarrollo de las células T, la migración de las células T vírgenes a la periferia, lo que finalmente restringe el

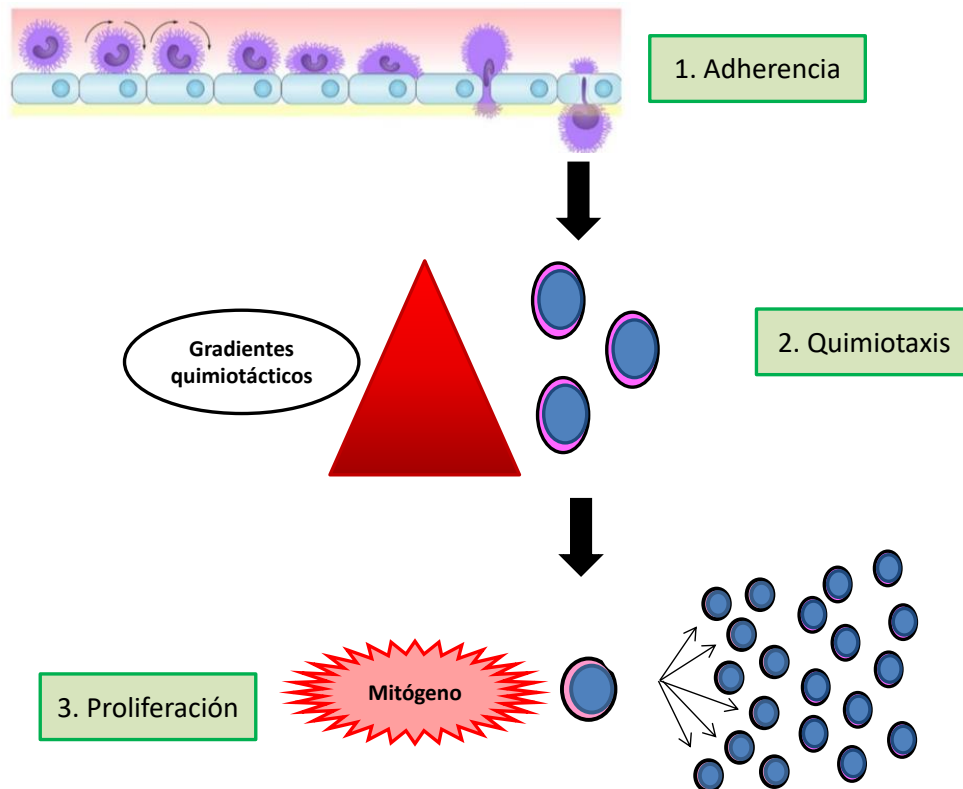


repertorio de estos linfocitos, lo cual estaría relacionado con una mayor morbilidad y mortalidad (Aspinall *et al.*, 2010; Ferránd-Martínez *et al.*, 2013). Así mismo, se produce un desequilibrio en las proporciones de linfocitos T de memoria y vírgenes, existiendo una acumulación de los primeros y una disminución de los últimos, lo que parece ser debido a la estimulación antigénica crónica que se va experimentando a lo largo de la edad (Franceschi *et al.*, 2000b). De hecho, las infecciones persistentes frecuentes en las personas de edad avanzada contribuyen al agotamiento de las células T y a la pérdida de la inmunovigilancia (Ongrádi y Kövesdi, 2010). Así, al avanzar la edad, las células vírgenes son reemplazadas por una expansión clonal de células T CD28- no funcionales o anérgicas en fase de senescencia replicativa (Sansoní *et al.*, 2008). Esta disminución en el potencial de expansión clonal llevaría a un deterioro de la función inmunitaria en la vejez, cuyas consecuencias son la incapacidad para luchar frente a infecciones de larga duración así como presentar una memoria inmunitaria más corta o ineficaz (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997). Por su parte, los linfocitos B también sufren modificaciones con el envejecimiento si bien han sido menos estudiadas, dándose alteraciones en los procesos de maduración en médula ósea, una disminución de los linfocitos B *naïve* frente a un aumento de los de memoria y así, una menor capacidad para reconocer nuevos antígenos y, por tanto, de producir anticuerpos (Ongrádi y Kövesdi, 2010; Holodick and Rothstein, 2015). Además, también se ha determinado que con el envejecimiento se produce un aumento de la producción de autoanticuerpos por parte de las células B, favoreciendo la aparición de procesos autoinmunes (Zhao *et al.*, 1995). Todas estas alteraciones comentadas que afectan a los linfocitos T y B, apoyarían el hecho observado de la menor efectividad de las vacunas en las personas de edad avanzada (Wick y Grubeck-Loebenstein, 1997).

Los linfocitos, al igual que los fagocitos, antes de ejercer su respuesta, tienen capacidad de adherirse y migrar hacia el foco de inflamación respondiendo a señales quimiotácticas (Doherty *et al.*, 1989; Hugli, 1989; Mackay e Imhof, 1993), para así alcanzar el lugar en el que reconocer los antígenos y proliferar de forma adecuada (**Figura 3**).

Con el envejecimiento, la **adherencia** de los linfocitos parece aumentar (McArthur, 1998; Hirokawa, 1999; De la Fuente y Victor, 2000), aunque algunos autores no han observado diferencias en este parámetro con la edad (Stohlawetz *et al.*, 1996). Así mismo, con el

envejecimiento los linfocitos también experimentan una menor **quimiotaxis** frente a diversos factores quimioatrayentes como el fMLP, en el caso de los linfocitos procedentes de diversas localizaciones en roedores (Ortega *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Arranz *et al.*, 2010a), así como frente a esfingosina 1 fosfato (S1P), CCL21 y fMLP en el caso de los linfocitos procedentes de sangre periférica humana (Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008a; Huang *et al.*, 2011).



**Figura 3. Ilustración de las funciones llevadas a cabo por los linfocitos.** La adherencia, la quimiotaxis o movilidad hacia el foco de infección a través de gradientes quimiotácticos y la proliferación en respuesta a diversos estímulos como los mitógenos (que mimetizan *in vitro* a los antígenos que pueden encontrarse las células *in vivo*). Estas funciones que se suceden de forma secuencial son esenciales para una adecuada inmunovigilancia y el proceso de reconocimiento antigénico.

Al alcanzar a la zona de reconocimiento del antígeno, un pequeño número de linfocitos específicos para dicho antígeno proliferan para combatirlo. Esta **capacidad proliferativa** se sabe que disminuye con el envejecimiento, hecho demostrado en numerosos estudios en los que se exponen a los linfocitos, tanto T como B, a mitógenos (que mimetizan *in vitro* la respuesta *in vivo* a los antígenos). Este deterioro de la proliferación con la edad se ha observado en los linfocitos de roedores y de sangre periférica humana expuestos a concanavalina A (ConA) y fitohemaglutinina (PHA) (mitógenos específicos de linfocitos

T), respectivamente (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008a). También se ha observado una menor respuesta proliferativa al envejecer de los linfocitos procedentes de roedores en presencia de lipopolisacárido (LPS), que estimula no sólo a linfocitos B sino también a monocitos/macrófagos y neutrófilos (Medina *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2004a; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010a). Con respecto a los linfocitos T, cabe añadir que además de una mermada capacidad proliferativa, con el envejecimiento también se ha observado una disminución de la producción de IL2 de forma más específica en las células T vírgenes y no en las células T de memoria (Adolfsson *et al.*, 2001) y que esas menores proliferación y producción de IL2, junto con un aumento del porcentaje de células T CD8+, se han propuesto como marcadores capaces de predecir la mortalidad (Pawelec *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1995). En cuanto a las modificaciones de la función de los linfocitos B con la edad, éstas parecen deberse en gran parte a una deficiente colaboración por parte de las células T (Malaguarnera *et al.*, 2001). Además, también se han observado un deterioro con el envejecimiento en la respuesta inmunitaria humoral mediada por estos linfocitos B, que se manifestaría en la peor respuesta a la vacunación de los ancianos (Song *et al.*, 1999; Ongrádi y Kövesdi, 2010); así como ausencia de cambios o aumento de anticuerpos circulantes, especialmente de autoanticuerpos (Weksler, 2000).

Hay que tener en cuenta que ambas ramas de la inmunidad, la innata y la adaptativa, no funcionan de forma independiente sino que lo hacen de forma íntimamente relacionada, proporcionando en su conjunto la defensa contra los patógenos (Ginaldi *et al.*, 1999), por lo que la alteración de una de ellas alteraría la actividad de la otra (Pawelec *et al.*, 1998). Además, la distribución clásica de células en una u otra inmunidad se está viendo modificada con los nuevos descubrimientos. Hoy se conoce la existencia de células linfoides innatas, las ILCs, de las que hay varios subtipos, y que complementan la inmunidad adaptativa (Almeida y Belz, 2016).

### **Las citoquinas**

Las acciones, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, requieren la participación de las citoquinas. Todos los componentes de ambas ramas del sistema inmunitario son capaces de producir estas proteínas, responsables de la comunicación entre las células y moduladoras de la función efectora durante la respuesta inmunitaria. Las citoquinas, al unirse y activar sus receptores específicos de

membrana, participan en numerosas funciones como la quimiotaxis, la proliferación, la diferenciación, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas (Ginaldi *et al.*, 1999; McNerlan *et al.*, 2002). En cuanto a su denominación, según la célula productora se conocen como linfoquinas (linfocito), monoquinas (monocito) o interleuquinas (IL; célula hematopoyética); pero también se clasifican como quimioquinas, si su función es la de inducir quimiotaxis e independientemente de su origen.

Con el envejecimiento se produce una alteración de la red de citoquinas producidas por los leucocitos durante la respuesta inmunitaria, tanto de las generadas durante la respuesta inmunitaria innata (Gon *et al.*, 1996; Krabbe *et al.*, 2001) como durante la adaptativa (Lio *et al.*, 1988; McNerlan *et al.*, 2002; Linton y Dorshkind, 2004). Además, los cambios en el patrón de producción de citoquinas durante la respuesta inflamatoria innata indicarían que la comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa también se encuentra alterada (van den Biggelaar *et al.*, 2004a).

Dentro de los componentes celulares del sistema inmunitario, las células T CD4+ o linfocitos T *helper* (Th) se han clasificado como Th1 y Th2 en función de las citoquinas que producen: IL2, IL12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en las respuestas de tipo Th1 o celular; e IL10, IL4, IL6, IL13 en las respuestas Th2 o humoral (Mossman y Sad, 1996). Con el envejecimiento, numerosos autores han observado un cambio en el equilibrio Th1/Th2, favoreciéndose, en principio, el segundo tipo de respuesta en detrimento de la primera. Este cambio en el perfil de citoquinas con la edad, contribuiría al proceso de inmunosenescencia (Shearer, 1997; Alberti *et al.*, 2006). No obstante, el escenario se hace cada vez más complejo con el descubrimiento de nuevos subtipos celulares de linfocitos Th, denominados de acuerdo a la citoquina que producen y sus efectos, como es el caso de las subpoblaciones Th17 (IL17), Th9 (IL9) o Th22 (IL22) así como poblaciones de células T reguladoras como Tr1 (TGF $\beta$ ) o Tr3 (IL10) (Weaver *et al.*, 2007; Annunziato y Romagnani, 2009; Noelle y Nowak, 2010).

Con el envejecimiento se producen cambios en los perfiles de citoquinas, favoreciéndose un perfil pro-inflamatorio que sustenta el aumento progresivo de la inflamación al envejecer (“inflamm-aging”) que, aunque de bajo grado es de tipo crónico (Franceschi *et al.*, 2000a). Este hecho contribuye a la pérdida del estado de salud y a la aparición de patologías. No obstante, se ha de tener en cuenta que las citoquinas pro-inflamatorias tienen un papel esencial en la inducción de la

respuesta inmunitaria frente a infecciones y cáncer, siendo crucial para la supervivencia (Franceschi, 2007). Por el contrario, una sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias, y particularmente una liberación descontrolada de las mismas, lo que parece ocurrir durante el envejecimiento, conllevaría a la pérdida de dicho papel protector frente a infecciones, llegando a ser considerado un factor de riesgo de enfermedades relacionadas con la inflamación (Biasucci *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2000; Ridker *et al.*, 2002; van den Biggelaar *et al.*, 2004b). En este sentido, el aumento de algunas citoquinas pro-inflamatorias, como IL6 o TNF $\alpha$ , se han relacionado con enfermedades cardiovasculares, el Alzheimer o la diabetes de tipo II (Bruunsgaard, 2002). Así, un control adecuado de los niveles de citoquinas es fundamental para lograr una respuesta inmunitaria adecuada y eficaz.

Como se ha indicado, con el envejecimiento aumentan, en general, las citoquinas pro-inflamatorias. Tal es el caso de IL1 $\beta$  (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), IL6 (Cohen *et al.*, 1997; Mariani *et al.*, 2006; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012), TNF $\alpha$  (Fagiolo *et al.*, 1993; Bruunsgaard *et al.*, 2000b; Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012) o IL8 (Mariani *et al.*, 2006). Por su parte, y probablemente con el objetivo de neutralizar ese aumento de las citoquinas pro-inflamatorias, se han observado, al envejecer, mayores cantidades de las anti-inflamatorias, entre los que destaca la IL10 (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2012). Con respecto a la IL2, considerado el factor de crecimiento de linfocitos T al ser clave para inducir la respuesta proliferativa de los linfocitos, se sabe que disminuye sus concentraciones con el envejecimiento (Mysliwska *et al.*, 1998).

Hay que tener presente que los componentes celulares del sistema inmunitario no son los únicos productores de las citoquinas circulantes sino que otros tipos celulares son también capaces de generar estos mediadores. Así, se ha observado que los adipocitos producen toda una serie de citoquinas pro-inflamatorias, denominadas por su origen adipocinas, como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6 que tendrían funciones en la regulación metabólica del tejido adiposo (Coppack, 2001). Con el envejecimiento, los adipocitos también sufren modificaciones en la producción de adipocinas o citoquinas, de manera que aumentan la expresión de las pro-inflamatorias, contribuyendo al aumento de la inflamación que de por sí se produce en el envejecimiento (Perdersen *et al.*, 2003; Cartier *et al.*, 2009). Otras fuentes de citoquinas serían el músculo esquelético o las células endoteliales, liberadoras de citoquinas pro-inflamatorias tales como

IL6 o TNF $\alpha$ , entre otras (Belmin *et al.*, 1995; Perdersen *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 2012). Por tanto, la existencia de unos niveles elevados de mediadores pro-inflamatorios, característicos del “inflamm-aging”, no es responsabilidad única del sistema inmunitario.

Por su parte, cabe mencionar que existe gran cantidad de resultados contradictorios en cuanto a cómo se modifican, con el envejecimiento, las citoquinas producidas durante una determinada respuesta inmunitaria frente a un estímulo *in vitro*, hallándose en la literatura que con la edad una misma citoquina puede aumentar, disminuir o no sufrir variaciones en sus concentraciones. Las fuentes de estas contradicciones son variadas, desde el estado de salud o la edad de los sujetos del estudio hasta la procedencia y procesamiento de la muestra biológica y la metodología empleada (como el tipo de estímulo elegido para desencadenar la producción y liberación de citoquinas *in vitro*). De hecho, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que, en función del contexto fisiológico en el que se valora una determinada citoquina, sus cantidades pueden variar sustancialmente (Mate, 2015).

### **1.2.3. La oxidación-inflamación como causa y efecto de la inmunosenescencia.**

Como se ha comentado anteriormente, el correcto funcionamiento del organismo depende del mantenimiento del equilibrio entre los niveles de oxidantes (ROS) y de antioxidantes. Con el envejecimiento, este equilibrio se pierde, debido a un exceso de los primeros o una menor disponibilidad de los segundos, estableciéndose un estrés oxidativo. El mantenimiento y agravamiento de este estrés oxidativo que sucede al envejecer, y que termina volviéndose crónico, subyacería a las alteraciones que afectan a la función de todos los sistemas del organismo, y muy especialmente de los sistemas reguladores nervioso, endocrino e inmunitario (Vida *et al.*, 2014), lo que conlleva la pérdida de la homeostasis y la aparición de patologías relacionadas con la edad de diversa índole, como el cáncer, la hipertensión, la aterosclerosis o las enfermedades neurodegenerativas (Ames *et al.*, 1993; Mecocci *et al.*, 2000; Daynes *et al.*, 2003; De la Fuente *et al.*, 2005; De la Fuente y Miquel, 2009).

Las células inmunitarias y particularmente las pertenecientes a la inmunidad innata, en su acción defensiva frente a los organismos invasores, generan una gran cantidad de ROS (Morel *et al.*, 1991). Por esta razón, el mantenimiento del equilibrio entre compuestos

oxidantes y antioxidantes en estas células es esencial para su correcta función pues por una parte la escasa producción de oxidantes no les permitiría llevar a cabo su papel defensivo y el exceso de los mismos podría deteriorarlas. De hecho, las células inmunitarias son muy susceptibles a la oxidación debido a sus componentes de membrana (Meydani *et al.*, 1995). Con el proceso de envejecimiento, se ha observado en las células inmunitarias un aumento de la producción de radicales libres acompañado de una menor capacidad antioxidante para neutralizarlos, hecho que subyace a la inmunosenescencia (Meydani *et al.*, 1995; De la Fuente y Miquel, 2009; Cannizzo *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2017).

A continuación se comentarán brevemente las modificaciones que sufren al envejecer algunos de los antioxidantes y oxidantes más estudiados.

Dentro de las defensas antioxidantes endógenas se encuentra el **glutati6n**.   ste es un antioxidante ti6lico no proteico, localizado en el interior celular y ubicuo. En su forma reducida (GSH) participa en numerosas funciones como la síntesis de ADN y proteica, transporte de aminoácidos, activaci6n de enzimas, mecanismos de se alizaci6n celular, la regeneraci6n de otros antioxidantes, el mantenimiento de los grupos -SH proteicos de la membrana y en la protecci6n celular al neutralizar radicales libres, como el hidroxilo (el más dañino de todos ellos) (Meydani *et al.*, 1995; Valko *et al.*, 2007; Pandey y Rizvi, 2010). Con respecto al papel del GSH en el sistema inmunitario, existe una relaci6n estrecha entre este antioxidante y la funci6n inmunitaria de manera que se postula que el mantenimiento de unas cantidades adecuadas de **GSH** asegura una correcta respuesta inmunol6gica (Meydani *et al.*, 1995). No obstante, con el envejecimiento se observa una disminuci6n de las concentraciones intracelulares de GSH así como de glutati6n total, tanto en animales de experimentaci6n como en humano (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a). Por su parte, la forma oxidada del glutati6n (GSSG) experimenta un aumento de sus concentraciones al avanzar la edad en roedores y en el ser humano (Samiec *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010a). El descenso de la cantidad de GSH, junto con el aumento de la de **GSSG** con el envejecimiento supone un aumento del cociente GSSG/GSH, considerado un buen indicador del estado de oxidaci6n celular, el cual se relaciona con el envejecimiento y con toda una serie de enfermedades (Jones *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004b; Kalinina *et*

*al.*, 2014; Mate *et al.*, 2015; Vida *et al.*, 2017). Así mismo, las enzimas **glutación peroxidasa (GPx)** y **glutación reductasa (GR)**, también experimentan cambios con la edad. La GPx es una enzima que cataliza la reducción de peróxidos, entre ellos el peróxido de hidrógeno, valiéndose del GSH, que se oxida, dando la forma GSSG (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999). Sobre ésta actúa a continuación la GR, en presencia de NADPH+H<sup>+</sup>, regenerando el GSH (Lu, 2013), cerrando el ciclo que se conoce como “ciclo del glutación” y asegurando el no agotamiento de las reservas celulares de GSH. En relación a los efectos del envejecimiento sobre estas dos enzimas, si bien existen resultados contradictorios, numerosos estudios, incluyendo de nuestro grupo de investigación, han observado una disminución de ambas actividades con la edad, tanto en roedores como en humanos (Matsubara y Machado, 1991; De la Fuente *et al.*, 2004a; 2005; De la Fuente 2008; Espinoza *et al.*, 2008).

Otro de los sistemas antioxidantes enzimáticos que se ve afectado con el envejecimiento es la **catalasa (CAT)**, enzima que actúa sobre el peróxido de hidrógeno, protegiendo a las células de su acción oxidativa. Existen resultados contradictorios acerca de cómo varía la actividad de esta enzima con la edad. Así, algunos autores han observado un aumento de esta actividad en eritrocitos y plasma de humanos (Inal *et al.*, 2001; Kasapoglu y Ozben, 2001; Junqueira *et al.*, 2004; Rizvi y Maurya, 2007), aunque otros han descrito una disminución de su actividad al envejecer en leucocitos de roedores (De la Fuente *et al.*, 2004b; Alonso-Fernández, 2006; Arranz *et al.*, 2010a; Gautam *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2017).

Dentro de los mecanismos de producción de oxidantes, cabe destacar la enzima **xantina oxidasa (XO)**, responsable de catabolismo de las purinas y que, como consecuencia de su acción, genera gran cantidad de ROS (como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno). Por ello, esta enzima parece jugar un papel importante en enfermedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo (Harrison, 2004a). Con el envejecimiento se ha descrito un aumento de su actividad enzimática en diversas localizaciones en roedores, como el hígado, la corteza cerebral, los leucocitos peritoneales y el plasma (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011; 2014; 2017) así como en el plasma de personas de edad avanzada (Aranda *et al.*, 2007).

Además, cabe destacar la existencia de una estrecha relación entre la oxidación y la inflamación. Así, se ha postulado que una producción exacerbada e incontrolada de radicales libres puede



inducir una respuesta inflamatoria, a través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Este factor de transcripción sensible al estado de oxidación parece desempeñar un papel central en la regulación de la inflamación así como en la inflamación crónica asociada con el envejecimiento o *inflamm-aging* (Kwon *et al.*, 2001; Daynes *et al.*, 2003; Sarkar y Fisher, 2006; Salminen *et al.*, 2008; Salminen y Kaarniranta, 2010; Cannizzo *et al.*, 2011). Por esta razón, no sólo el envejecimiento *per se*, sino numerosas patologías asociadas con este proceso como la hipertensión y la disfunción endotelial (De la Fuente *et al.*, 2005; Csiszar *et al.*, 2008), la aterosclerosis (Lobby, 2007) y las enfermedades neurodegenerativas (Yuan *et al.*, 2007) incluyen en su patogenia no sólo procesos oxidativos sino también inflamatorios.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado, la teoría de la oxidación-inflamación (De la Fuente y Miquel, 2009) aportaría una visión completa e integradora de los procesos que subyacen con el envejecimiento. En este contexto, mantener un adecuado equilibrio no sólo de oxidantes y antioxidantes sino también de compuestos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios preservaría una apropiada función inmunitaria, manteniendo la salud del individuo y aumentando, consecuentemente, las posibilidades de lograr un envejecimiento saludable y una mayor longevidad. Contrariamente, el no hacerlo supone una mayor velocidad de envejecimiento. En este contexto, considerando la causa de la inmunosenescencia, se puede proponer a la misma como una prueba de que los efectos beneficiosos de tener un sistema inmunitario en edades tempranas con potente respuesta inflamatoria para defendernos de los patógenos, puede resultar perjudicial en la vejez, la cual representa, por otra parte, una etapa de la vida no prevista por la evolución (De Martinis *et al.*, 2005). Además, revalorando el papel del sistema inmunitario, y teniendo en cuenta que de todas las células inmunitarias son los fagocitos los más implicados en el mayor estrés oxidativo del envejecimiento (Vida *et al.*, 2017), se puede entender la propuesta de que este sistema puede ser utilizado por la naturaleza para controlar la esperanza de vida media de los individuos (De la Fuente y Miquel, 2009).

### **1.2.4. El sistema inmunitario como marcador de edad biológica y predictor de longevidad**

Como se ha comentado anteriormente, el mantenimiento de una correcta respuesta inmunitaria se ha postulado como predictor no sólo

de salud sino también de longevidad (Wayne *et al.*, 1990). En este sentido, nuestro grupo de investigación recientemente ha propuesto algunos parámetros de función inmunitaria, tales como la quimiotaxis, la fagocitosis, la actividad NK y la proliferación, como marcadores de edad biológica, válidos para determinar la velocidad a la que un individuo (tanto humano como ratón) envejece, y predictores de longevidad (Martínez de Toda *et al.*, 2016). Los estudios realizados tanto en sujetos con una inmunosenescencia prematura y una menor esperanza de vida así como de aquellos que alcanzan una elevada longevidad han permitido fundamentar este concepto. Así, nuestro grupo lleva desarrollando desde hace años un modelo de envejecimiento prematuro en ratón, que se comentará con mayor detalle en el siguiente apartado de la presente introducción, que ya en la edad adulta manifiesta un deterioro funcional de los sistemas reguladores, entre ellos el inmunitario, mayores niveles de estrés oxidativo y una menor longevidad que sus congéneres del mismo género y edad cronológica. Por su parte, los estudios del sistema inmunitario realizados en personas centenarias y ratones excepcionalmente longevos demuestran que estos sujetos manifiestan una función inmunitaria y un estrés oxidativo no sólo mejores que los de personas de edad avanzada y animales viejos, sino que incluso algunos de estos parámetros se asemejan a los observados en los individuos adultos (Puerto *et al.*, 2005; Alonso-Fernández *et al.*, 2008; Arranz *et al.*, 2010a; De la Fuente, 2014a; Mate, 2015).

Por lo tanto, el sistema inmunitario no sólo jugaría un papel esencial en el mantenimiento de un buen estado de salud y en la longevidad sino que también constituye una herramienta válida para medir la velocidad a la que se produce el envejecimiento, esto, la edad biológica. Siguiendo esta idea, aquellos individuos adultos cuyos parámetros inmunitarios arriba mencionados muestren unos valores similares a los observados en sujetos de edades avanzadas, manifestarán una mayor edad biológica y una longevidad menor. Por el contrario, aquellos que muestren unos valores semejantes a los mostrados por individuos más jóvenes, tendrán una menor edad biológica y vivirán más.

### **1.2.5. La comunicación psiconeuroinmunoendocrina se modifica con el envejecimiento.**

Como ya se ha indicado anteriormente los sistemas reguladores que controlan la homeocinesis del organismo no trabajan aisladamente sino que establecen relaciones íntimas conformando la comunicación

psiconeuroinmunoendocrina (Ader y Cohen, 1975; Cousins, 1989; Rabin, 1999; Besedovsky and Del Rey, 2007; Nemeroff, 2013). Con el envejecimiento cada uno de esos sistemas se deteriora y también su comunicación lo que lleva a una pérdida de la homeostasis y a un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Fabris, 1990; Straub *et al.*, 2001; De la Fuente 2009; De la Fuente, 2014a).

En este contexto, una inadecuada respuesta al estrés supone uno de los mejores ejemplos de cómo se deteriora la comunicación psiconeuroinmunoendocrina con el envejecimiento. Esta inadecuada respuesta a situaciones estresantes se traduciría en una mala salud inmunitaria y de todos los sistemas fisiológicos, lo que supone un peor envejecimiento (McEwen, 2002; Blalock, 2005; Bauer, 2005; Bauer *et al.*, 2009). De hecho, actualmente se postula que el estrés es un factor de riesgo para acelerar el proceso normal de envejecimiento, la inmunosenescencia y la aparición de patologías asociadas a la vejez, como las de tipo neurodegenerativo (Espinosa-Oliva *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2014). Estos efectos del estrés, y más concretamente del estrés psicológico, sobre la función de los sistemas reguladores y de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina se comentarán en el siguiente apartado de forma más detallada.

Dada la complejidad de esta comunicación, aún está por determinar si al envejecer son las alteraciones en el sistema inmunitario las que inducen cambios en el sistema nervioso o si son las modificaciones neurológicas las que los generan a nivel inmunitario. Posiblemente, ambos procesos ocurren de forma simultánea, como han propuesto algunos autores (Bellinger *et al.*, 2011). No obstante, nuestro grupo de investigación ha observado que con la edad las células inmunitarias no responden o cambian su respuesta a los neurotransmisores y hormonas, independientemente de la cantidad que reciban de los mismos (De la Fuente *et al.*, 2000; 2001; De la Fuente y Medina, 2005).

### **1.3. EFECTOS DEL ESTRÉS SOBRE LOS SISTEMAS REGULADORES Y LA COMUNICACIÓN PSICONEUROINMUNOENDOCRINA**

La bidireccionalidad de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina permite que cualquier estímulo que afecta a los sistemas nervioso y endocrino influya en el inmunitario y viceversa. En base a ello, estímulos negativos como el estrés emocional, la ansiedad o la depresión, alteran la respuesta inmunitaria, modificándose la comunicación psiconeuroinmunoendocrina.

Consecuentemente, se pierde la capacidad de mantener un correcto equilibrio homocinético, desarrollándose diversas patologías relacionadas con ese estrés (Arranz *et al.*, 2007; 2009a; Costa-Pinto y Palermo-Nieto, 2010). En este apartado de la introducción de la presente Tesis, se comentarán los efectos generales del estrés, haciendo especial hincapié en el estrés de tipo psicológico, sobre los sistemas reguladores.

Como se ha comentado en apartados anteriores, el estrés supone uno de los mejores ejemplos de cómo funciona la comunicación psiconeuroinmunoendocrina. Si bien numerosos estudios se han centrado en estudiar los efectos del estrés en ese contexto, aún en la actualidad no se tienen ideas totalmente claras ni se ha alcanzado un consenso sobre sus efectos sobre el organismo. Es evidente que los resultados obtenidos sean muy contradictorios debido a toda una variedad de factores, tales como el tipo de estrés utilizado, el tiempo de exposición, el estado emocional del individuo que padece dicho estrés, la edad de los sujetos del estudio, etc. que pueden estar incidiendo.

El estrés, o más correctamente la **respuesta al estrés**, puede definirse como las modificaciones fisiológicas que manifiesta un individuo en respuesta a los cambios ambientales o psicosociales. Ante estos estímulos estresantes, el individuo puede desarrollar distintas respuestas o estrategias. Las respuestas o estrategias de tipo pasivo o conservadoras o de huida (conocidas en inglés como *flight strategies*), se manifiestan con el objetivo de proteger al organismo de las consecuencias derivadas del estrés al que se enfrenta. Por el contrario, las respuestas o estrategias activas o de lucha (en inglés *fight strategies*) buscan enfrentarse y eliminar el origen del estrés correspondiente (Engel y Schmale, 1972). Con independencia del tipo de estrategia seleccionada, de huida o de lucha (*flight* o *fight*), si el individuo es capaz de responder con éxito o de forma adaptativa al estrés al que se enfrenta, sobrevivirá, asegurando su éxito reproductor y, en última instancia, su éxito evolutivo. Siguiendo esta idea, la respuesta al estrés es esencial para la vida. No obstante, si el sujeto es incapaz de lidiar con el factor estresante, manifestará respuestas fisiológicas que, si bien pueden ser potencialmente adaptativas, resultarán inadecuadas. En este contexto, una respuesta inapropiada al estrés alterará el funcionamiento de los sistemas reguladores y de la comunicación entre ellos lo que finalmente supone la pérdida de la homeocinesis y el consecuente aumento de la morbilidad y, en última instancia, de la mortalidad.

### 1.3.1. La respuesta neuroendocrina al estrés.

La exposición a un estrés, tanto físico como psicológico, resulta en la activación secuencial y coordinada de toda una serie de neurotransmisores y hormonas (Jöels y Baram, 2009), fundamentalmente componentes de los ejes Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y Simpático-Adreno-Medular (SAM) (**Figura 4**).

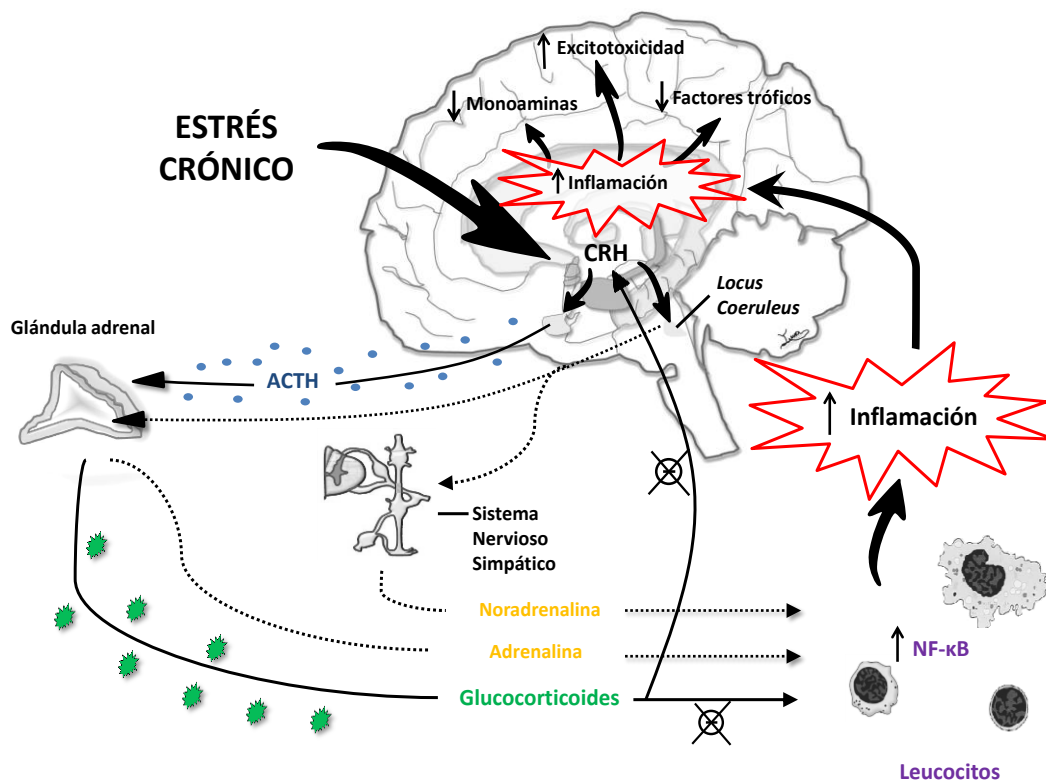
En cuanto a la activación del **eje HHA**, considerado el principal eje implicado en la respuesta al estrés y ampliamente estudiado en este contexto, en primer lugar se produce una liberación a nivel del sistema nervioso central de las monoaminas, incluyendo la noradrenalina (NA), la dopamina y la serotonina, que inician la respuesta al estrés de forma inmediata (Ulrich-Lai y Herman, 2009). A continuación, las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés *corticotrophin-releasing hormone*), que se libera en la eminencia media y es transportada hacia la hipófisis anterior o adenohipófisis a través del sistema portal. En la adenohipófisis, la CRH induce la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH, del inglés *adrenocorticotrophin hormone*) al torrente circulatorio. Una vez que la ACTH alcanza las glándulas adrenales, ésta estimula células de la corteza adrenal que inmediatamente liberan glucocorticoides (GC), corticosterona en la mayoría de los roedores o cortisol en el humano. Por tanto, la activación del eje HHA se traduce en un aumento de los niveles de GC en plasma, los cuales ejercen sus acciones tras unirse a receptores específicos expuestos por las células en los tejidos periféricos (Sapolsky *et al.*, 1984; Bhatnagar y Dallman, 1998) y en el cerebro (Herman *et al.*, 2005; Chauveau *et al.*, 2009).

Existen dos tipos de receptores de GC: los receptores de mineralocorticoides (MR) y los de glucocorticoides (GR). Los MR muestran una alta afinidad por la corticosterona y pueden activarse incluso en ausencia de estrés (Reul y de Kloet, 1985). Por el contrario, los GR muestran una afinidad mucho menor por la corticosterona (del orden de 10 veces menos) y únicamente se activan en una situación de estrés o durante los picos circadianos de su molécula activadora. Ambos tipos de receptores son intracelulares y actúan como factores de transcripción al unirse su ligando específico, momento en el que se translocan al núcleo donde regulan la transcripción génica, bien de forma directa (uniéndose a sitios específicos en el ADN) o indirectamente (interaccionando con otros factores de transcripción) (Beato y Sanchez-Pacheco, 1996; Datson *et al.*, 2008). Estas acciones,

en última instancia, conllevarán la puesta en marcha de diversos procesos celulares (Datson *et al.*, 2009).

Los receptores de GC se expresan en diversas localizaciones del sistema nervioso central. Con respecto a la distribución de los MR, ésta se concentra principalmente en células nerviosas del sistema límbico, el hipocampo, la corteza pre-frontal y la amígdala (Reul y de Kloet, 1985), desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad y la función de los circuitos límbicos así como en la evaluación de situaciones novedosas (de Kloet *et al.*, 1999; Joëls *et al.*, 2008). En cuanto a la expresión de los GR, éstos se localizan en neuronas y células gliales a lo largo de todo el cerebro, siendo especialmente abundantes en el núcleo paraventricular hipotalámico y en el hipocampo (Reul y de Kloet, 1985). La acción fundamental de los GR en el cerebro supone modular la respuesta al estrés, facilitando el mecanismo de retroalimentación negativo de los GC en el eje HHA mediante una acción directa sobre la hipófisis y el hipotálamo o bien de forma indirecta actuando sobre estructuras del sistema límbico (Keller y Dallman, 1984; de Kloet *et al.*, 2008). Así mismo, los GC también participan en funciones como la memoria o el aprendizaje a través de sus receptores, de forma que los MR parecen más implicados en procesos de aprendizaje (Oitzl *et al.*, 2001) mientras que los GR jugarían un papel más destacado en la consolidación de la memoria (Oitzl y de Kloet, 1992; de Kloet *et al.*, 1999).

Varios estudios han demostrado que los GC pueden ejercer efectos inmediatos (del orden de minutos) sin actuar sobre los genes de neuronas hipocampales y del hipotálamo (Di *et al.*, 2005; Karst *et al.*, 2005; Roozendaal *et al.*, 2010), alterando la función cerebral (Wiegert *et al.*, 2006) e influyendo en la actividad del eje HHA (Dallman, 2005). Así mismo, los GC también modulan determinados procesos conductuales, aumentando la locomoción de tipo dirigida o el comportamiento agresivo (Sandi *et al.*, 1996; Mikics *et al.*, 2004), así como cognitivos, tanto en animales de experimentación como en humanos (Groeneweg *et al.*, 2011).



**Figura 4. Efectos del estrés crónico sobre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario.** La exposición a una situación estresante supone la activación de los ejes HHA y SAM. Por un lado, se produce la liberación de CRH desde el núcleo paraventricular hipotálamico que induce la activación del *locus coeruleus* así como la activación del sistema nervioso simpático y de la médula adrenal, que secretan las catecolaminas (CA) NA y A, respectivamente. A continuación, la CRH se transporta a la hipófisis anterior, donde se induce la liberación de ACTH al torrente circulatorio. Esta ACTH actúa sobre la glándula adrenal que secreta GC (cortisol o corticosterona). Tanto los GC como las CA se consideran como las hormonas del estrés más importantes y ejercen diversas acciones sobre el sistema inmunitario. En el caso de que el estrés sea agudo, tanto la NA como la A potencian las respuestas inmunitarias para asegurar la supervivencia del organismo. Por el contrario, ante un estrés crónico se produce una activación predominante del eje HHA. Como consecuencia, el mantenimiento de unas concentraciones elevadas de GC (y también de CA) plasmáticas supone una menor expresión de los receptores GR así como una disminución de la sensibilidad del eje HHA a los GC. Esta menor expresión de los receptores GR conlleva la pérdida del mecanismo de retroalimentación negativo de los GC sobre el eje HHA, contribuyendo al mantenimiento de unos niveles elevados de los mismos en el plasma. Así mismo, esta situación produce que el sistema inmunitario sea menos sensible a los efectos de los GC, lo que resulta en una pérdida de los mecanismos de control sobre factores de transcripción pro-inflamatorios (como el NFκB), estableciéndose una inflamación de bajo grado que se mantiene en el tiempo. Este aumento de la inflamación afecta al sistema nervioso, produciéndose un aumento de la excitotoxicidad así como una disminución de los niveles de monoaminas cerebrales así como de diversos factores neurotróficos. Todo ello, en última instancia, favorece el desarrollo de diversas patologías de tipo inflamatorio características de los individuos crónicamente estresados. (Obtenido y modificado de Cruces *et al.*, 2014).

### *Estrés agudo vs estrés crónico*

La respuesta a un determinado estrés puede variar dependiendo de diversos factores. Uno de ellos sería la duración del tiempo de exposición a la situación o factor estresante. En este sentido, Elliot y Eisdorfer (1982) han clasificado a los estímulos desencadenantes de estrés, en función de su duración y su curso (puntual o continuado), en cinco grandes tipos: 1) **factores estresantes agudos y limitados en el tiempo**, que refieren desafíos o estreses muy puntuales como resolver una fórmula matemática; 2) **factores estresantes breves**, que incluyen las respuestas de estrés que experimenta un individuo cuando se enfrenta a un desafío de corta duración, como un examen; 3) **secuencias de eventos estresantes**, que refieren a eventos que suceden como consecuencia de una serie de desafíos o estreses relacionados, como por ejemplo el que sufre el sujeto ante un desastre natural; 4) **factores estresantes crónicos**, que se caracterizan por su estabilidad en el tiempo, haciendo plantearse al individuo si alguna vez dicha situación finalizará, llegando incluso a re-estructurar su identidad o papel social, como es el caso de algunas personas que cuidan a un pariente con demencia; 5) **factores estresantes lejanos o distantes**, que incluyen aquellas situaciones estresantes que ocurrieron en el pasado pero siguen influenciando al sujeto, como situaciones traumáticas sufridas durante la niñez. Esta clasificación, algo antropocéntrica y psicológica, es un claro ejemplo de la complejidad de las respuestas al estrés de forma que para favorecer la comprensión de los efectos de éste sobre el organismo, se suele simplificar la clasificación de los factores estresantes en agudos o de corta duración y crónicos o de larga duración.

Como se ha mencionado con anterioridad, los ejes HHA y SAM suponen las vías principales involucradas en la respuesta al estrés (**Figura 4**). No obstante, ante una situación estresante, también se activan otras vías neuroendocrinas tales como el sistema renina-angiotensina y vías hipotalámicas, que desencadenan la liberación no sólo de GC y catecolaminas (CA) sino también de otros moduladores como los opiáceos, la dehidroepiandrosterona (DHEA), la hormona del crecimiento (GH) o la prolactina. Sin embargo, el grado de activación de estos componentes neuroendocrinos dependerá de diversos factores, siendo el tiempo de duración del estímulo estresante uno de los más importantes. Así, se propone que el eje SAM se activa de forma predominante cuando el individuo que enfrenta la situación estresante es capaz de mantener el control de dicha situación, mientras que el eje



HHA parece activarse de forma dominante en situaciones de estrés que provocan en el sujeto una pérdida de control o incluso una sensación de impotencia (Henry y Wang, 1998). Por lo tanto, se puede decir que un estrés de tipo agudo activará de forma primordial al eje SAM y, por el contrario, el eje HHA se activará, mayoritariamente, durante un estrés crónico. No obstante, se debe tener en cuenta que una activación del eje HHA no resulta sólo en un aumento de los niveles de GC sino que también se liberan CA desde la médula adrenal (Carrasco y Van de Kar, 2003), por lo que ambas coexisten durante la respuesta a un determinado estrés, independientemente de su tiempo de duración.

### **1.3.2. Efectos del estrés sobre el sistema inmunitario.**

Existen numerosas evidencias acerca de la relación entre el sistema inmunitario y el estrés. De hecho, existen terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático tanto en los tejidos linfoides primarios (médula ósea y timo) como secundarios (bazo, nódulos linfáticos) (Felten *et al.*, 1988; Felten y Felten, 1994). Es más, los mediadores del eje SAM, como la NA y adrenalina (A), pueden unirse a sus receptores específicos, los receptores adrenérgicos, expresados por las células inmunitarias y, en particular, a los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (Madden, 2003). Así mismo, los leucocitos también expresan receptores para los GC (Marchetti *et al.*, 2001).

A través de los receptores anteriormente mencionados, tanto las CA como los GC modulan una gran variedad de funciones del sistema inmunitario como el tráfico leucocitario, la proliferación, la secreción de citoquinas, la producción de anticuerpos y la actividad citolítica (Madden *et al.*, 1995; Besedovsky y Del Rey, 2011). Además, si bien las CA y los GC son las hormonas del estrés con capacidad para actuar sobre las células inmunitarias que han sido más estudiadas, otros factores que también son liberados durante esta respuesta, incluyendo la prolactina, la GH, la melatonina, DHEA,  $\beta$ -endorfina y encefalina, también inducen cambios en la respuesta inmunitaria.

A pesar de que la interacción entre el estrés y la inmunidad ha sido ampliamente estudiada, las ideas sobre dicha relación han cambiado a lo largo del tiempo. Tradicionalmente, se postulaba que el estrés ejercía un efecto inmunosupresor dado que se había observado que individuos estresados mostraban una atrofia de algunos de sus tejidos linfoides (Selye, 1937). También se asumía que el estrés crónico inducía una disminución de la actividad NK y de la capacidad de proliferación de los linfocitos junto con una respuesta de anticuerpos

deficiente (Herbert y Cohen, 1993; Kiecolt-Glaser *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 2001). Este concepto aceptado durante mucho tiempo de que el estrés induce un efecto netamente inmunosupresor está siendo reconsiderado. En este contexto, se ha propuesto que los efectos del estrés sobre el sistema inmunitario serían duales de manera que la respuesta inmunitaria se vería potenciada por el estrés agudo y suprimida por el estrés crónico. Por tanto, las CA actuarían activando la inmunidad y los GC la suprimirían (Cruces *et al.*, 2014).

Por su parte, se sabe que la activación de los receptores GR induce efectos anti-inflamatorios, inhibiendo la transcripción del NF- $\kappa$ B y otras vías pro-inflamatorias (Rhen y Cidlowski, 2005; Pace *et al.*, 2007). Paradójicamente, los individuos estresados de forma crónica son más susceptibles a padecer enfermedades inflamatorias (Cohen y Herbert, 1996; Kiecolt-Glaser *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2002). Una posible explicación ante esta contradicción se encontraría en el modelo de resistencia a los GC propuesto por Miller y colaboradores (2002). Según este modelo, los individuos crónicamente estresados se encuentran expuestos durante largos periodos de tiempo a unos niveles de GC elevados que terminan por afectar a los GR, induciendo su inactivación y, por tanto, disminuyendo la respuesta de las células inmunitarias a los efectos de los GC. Así mismo, también se ha sugerido que la A y la NA participarían en este proceso de inactivación de los GR (Maccari *et al.*, 1992; DeRijk *et al.*, 1996). Por consiguiente, el estrés crónico atenuaría el efecto anti-inflamatorio de los GC sobre los leucocitos, contribuyendo a mantener el estrés inflamatorio de bajo grado que se da en los individuos sometidos a un estrés durante periodos de tiempo prolongados. Es más, unos niveles aumentados de GC pueden llevar a un aumento de la grasa abdominal y al desarrollo del síndrome metabólico. En este escenario, los adipocitos activados y los macrófagos infiltrados en el tejido graso liberarían al torrente circulatorio compuestos pro-inflamatorios, tales como las IL-6 y 8, leptina y TNF $\alpha$  (Ouchi *et al.*, 2011), que también contribuirían al mantenimiento de esa inflamación.

Por tanto, la compleja respuesta al estrés supone la activación de toda una serie de componentes neuroendocrinos, más allá de los ejes HHA y SAM, que ejercerán sus efectos sobre el sistema inmunitario. Efectos que dependerán de las características del estrés, particularmente del tiempo de duración del mismo. De forma general, un estrés agudo inducirá en el sistema inmunitario cambios adaptativos con el objetivo de proteger al organismo de una posible

lesión o infección durante la respuesta de “huída o lucha”, potenciando la respuesta inmunitaria innata ya que su activación es rápida y requiere poco gasto energético. Por el contrario, la activación de la inmunidad adquirida, y particularmente de la capacidad proliferativa de los linfocitos, requiere más tiempo y energía. Conforme la exposición al estrés se prolonga, convirtiéndose en crónica, se reduce la capacidad de adaptación a los cambios que éste induce, de manera que el estrés crónico conllevaría una inmunosupresión de ambas ramas de la inmunidad, innata y adquirida (Segerstrom y Miller, 2004).

Teniendo en cuenta que en la presente Tesis, uno de los principales temas a tratar es el aislamiento social (que se introducirá en el siguiente apartado), considerado un potente estrés de tipo psicológico, a continuación se detallarán los efectos más destacables de este tipo de estrés sobre el sistema inmunitario.

### ***Estrés psicológico y las inmunidades innata y adquirida***

El estrés psicológico puede definirse como todo aquel estímulo estresante o desafío que no necesariamente induce la típica respuesta física de “huída o lucha” pero sí provoca los cambios fisiológicos y psicológicos o emocionales característicos de una respuesta de estrés. Como todo estrés, el estrés psicológico altera la comunicación psiconeuroinmunoendocrina, llegando incluso a comprometer la salud del individuo que lo padece.

Diversos autores han observado que el estrés psicológico puede inducir cambios tanto cuantitativos como cualitativos en los componentes celulares de la **inmunidad innata**, los fagocitos y las células NK. En general, un estrés de tipo agudo aumenta el número y potencia la actividad de las **células NK** (Naliboff *et al.*, 1991; Segerstrom y Miller, 2004), que parecen ser consecuencias de la acción de la NA y A liberadas por el eje SAM (Hurwitz *et al.*, 2005). Por el contrario, la exposición a un estrés crónico reduciría la actividad de estas células (Segerstrom y Miller, 2004; Gouin *et al.*, 2008), además de disminuir su capacidad de respuesta a las citoquinas (Gouin *et al.*, 2008). Aunque parece que el estrés psicológico también modifica el número y la función de los **fagocitos**, se han hallado en la literatura resultados contradictorios a este respecto. De esta manera, ratones expuestos repetidamente a estrés social experimentan un incremento en la población de monocitos/macrófagos esplénicos, que aumentarían su producción de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión de los receptores tipo *toll* (TLR) 2 y 4, potenciando su actividad microbicida

*in vitro* (Bailey *et al.*, 2007). Este aumento de la capacidad microbicida también se ha observado en neutrófilos de sangre periférica humana en sujetos expuestos a un estrés psicológico agudo (Khanfer *et al.*, 2010). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la NA liberada por la exposición a un estrés psicológico agudo (inmediatamente tras la inducción de una herida) atenuaría la activación de los macrófagos M1, esenciales en el proceso de cicatrización (Kuebler *et al.*, 2013). *A priori*, estos hallazgos apuntan a que este estrés agudo produciría inmunosupresión, a pesar de que está aceptado que las CA activan las respuestas inmunitarias. Estas contradicciones observadas en la literatura podrían deberse a diferencias en los diseños experimentales y la metodología empleada. No obstante, ambas situaciones no tienen por qué ser mutuamente excluyentes ya que la menor capacidad microbicida de los macrófagos puede verse compensada por un aumento en el número de estas células en el foco del daño, con el objetivo de preservar la efectividad de la respuesta inmunitaria ante un estrés agudo.

Con respecto a la **inmunidad adquirida** y, concretamente, a los **linfocitos**, estas células poseen receptores específicos para las hormonas del estrés, GC y CA. En el caso de los receptores adrenérgicos, su densidad y sensibilidad difieren entre las distintas poblaciones de linfocitos y, consecuentemente, la respuesta al estrés de estas subpoblaciones celulares también variará. Como ejemplo, en los linfocitos B la expresión de receptores  $\beta 2$  adrenérgicos es elevada pero presentan una afinidad baja por su ligando; por el contrario, en las células T la densidad de estos receptores es menor (Landmann, 1992; Anstead *et al.*, 1998).

En cuanto a los efectos del estrés psicológico sobre la función de los **linfocitos B**, se sabe que induce cambios en la capacidad de estas células para producir anticuerpos. Así, se ha observado que el estrés agudo incrementaría la respuesta de anticuerpos a vacunas (Edwards *et al.*, 2008), aunque este efecto parece ser poco potente y de corta duración. Por su parte, el estrés crónico se ha asociado con una respuesta deficiente de anticuerpos frente a vacunas contra diversos patógenos como virus *influenza*, hepatitis B y virus respiratorios (Cohen *et al.*, 1991; Petrie *et al.*, 1995; Vedhara *et al.*, 1999; Glaser *et al.*, 2000). En los mecanismos que subyacen a estas alteraciones de la inmunidad humoral parecen participar los GC (Cohen *et al.*, 1991; Petrie *et al.*, 1995; Vedhara *et al.*, 1999; Glaser *et al.*, 2000), y otras hormonas del estrés como la NA, la A, la prolactina y la GH (Wu *et al.*,

1999). Así mismo, el estrés psicológico se ha relacionado con un peor control sobre infecciones víricas que permanecen en estado latente en condiciones fisiológicas normales, como los herpes virus (Glaser *et al.*, 1987; Glaser y Kiecolt-Glaser, 1997). Esta falta de control podría ser debida a que el estrés alteraría el proceso de presentación antigénica de las células B a los linfocitos T, produciéndose un descenso de las células T de memoria específica frente a este tipo de virus (Glaser *et al.*, 1987; Glaser y Kiecolt-Glaser, 1997). Un control inadecuado de los virus latentes junto con una alteración de la producción de anticuerpos frente a vacunas resultaría en un aumento de la susceptibilidad a sufrir numerosas patologías, hecho observado en individuos sometidos a estrés psicológico crónico (Cohen *et al.*, 1999; Glaser *et al.*, 2001; Dimsdale, 2008).

Con respecto a los **linfocitos T**, y al igual que lo observado en los linfocitos B, el estrés psicológico agudo y crónico induce un deterioro funcional en estas células, que muestran una menor respuesta de proliferación de las células T en presencia de varios estímulos mitogénicos (que mimetizan *in vitro* la respuesta a los antígenos que sucede *in vivo*), tales como la PHA, la ConA y el *pokeweed* (PWM) (Bartrop *et al.*, 1977; Kiecolt-Glaser *et al.*, 1991; Delahanty *et al.*, 1996).

### ***Estrés psicológico y citoquinas***

Los efectos del estrés psicológico sobre la producción y liberación de citoquinas son muy variados y dependerán notablemente de la duración de la situación estresante.

Así, algunos autores han observado que el estrés psicológico agudo, a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, induciría un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IL6 y proteína C reactiva (PCR) (Brydon *et al.*, 2009) e IL1 $\beta$  (Gu *et al.*, 2012), entre otras.

Por su parte, el estrés psicológico crónico parece inducir un cambio en el equilibrio de citoquinas Th1/Th2 hacia Th2, hallándose un descenso de los niveles de citoquinas de tipo 1 tales como IFN, IL2 e IL12 acompañado de un mantenimiento o incluso aumento de los niveles de las citoquinas de tipo Th2, como IL10 e IL4. Este cambio en el balance Th1/Th2 sugiere que el estrés psicológico crónico podría potenciar y atenuar la respuesta inmunitaria de forma simultánea. De esta forma, un descenso de la respuesta Th1 celular se traduciría en una mayor vulnerabilidad a padecer procesos infecciosos y

neoplásicos, mientras que un aumento de la respuesta humoral Th2 incrementaría la probabilidad de sufrir enfermedades alérgicas y autoinmunes. Este desequilibrio Th1/Th2 hacia Th2 debido a la exposición crónica a un factor estresante psicológico relacionaría los cambios que se producen a nivel inmunitario con las enfermedades asociadas con dicho estrés, esto es, tener una función inmunitaria deficiente pero a su vez excesivamente activada (Marshall *et al.*, 1998) que manifiestan los individuos crónicamente estresados.

### **1.3.3. Factores moduladores de la respuesta al estrés: resiliencia, hormesis y ansiedad.**

El estrés y especialmente el de tipo crónico, como se ha comentado, induce cambios en el organismo, incluyendo a los sistemas reguladores, que pueden comprometer la salud del individuo e incluso reducir su esperanza de vida. No obstante, existen diferencias individuales en la respuesta a un determinado estrés que pueden ser debidas a diferentes factores. Algunos de ellos son inherentes al individuo, como puede ser la edad a la que se enfrenta a la situación estresante o a los mecanismos de defensa que emplea ante ese estrés, utilizando estrategias conductuales y fisiológicas para reducir los efectos del estrés y que, por tanto, pueden determinar el éxito o el fracaso de la respuesta al mismo. En los animales de experimentación, estos mecanismos de defensa resultan fundamentales para el mantenimiento de la capacidad de adaptarse al ambiente en constante cambio (Steimer, 2002) y podrían compararse con la “personalidad” en el ser humano, y en su desarrollo parecen influir diversos factores como pueden ser la resiliencia, la hormesis o la ansiedad, que se comentarán brevemente a continuación.

Las estrategias o mecanismos de defensa se han relacionado con la **resiliencia** (Feder *et al.*, 2009), que supone la capacidad del individuo de adaptarse con éxito a situaciones estresantes adversas, manteniendo en condiciones adecuadas el funcionamiento tanto psicológico como fisiológico, constituyendo un proceso de gran complejidad en el que participan variados y numerosos factores (Russo *et al.*, 2012; Rutter, 2012; Southwick y Charney, 2012). Cada individuo se enfrenta a situaciones o eventos estresantes, incluso traumáticos, a lo largo de su vida, pudiendo llegar a desarrollar enfermedades psiquiátricas. No obstante, la mayoría de los sujetos no manifiestan este tipo de enfermedades, proponiéndose como individuos resilientes. Si bien la resiliencia se lleva estudiando desde hace relativamente poco tiempo, se conocen algunos factores que participarían en su desarrollo,

incluyendo factores genéticos, tales como genes y polimorfismos asociados con el NPY, el eje HHA, los sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*). También hay que considerar factores ambientales que inducen cambios epigenéticos, destacándose la exposición a situaciones traumáticas en las primeras etapas de la vida tales como abuso sexual o maltrato en la infancia así como la posibilidad de recibir apoyo para sobrellevarlos. En este aspecto, habría que tener en cuenta los factores psicosociales, incluyendo el poseer un alto rendimiento intelectual, manifestar mecanismos de defensa adecuados ante el estrés, tener una visión positiva y optimista o establecer lazos sociales sanos y fuertes. Y por supuesto, influyen factores neuroquímicos, como la producción de NPY, de las hormonas del estrés (GC y CA) o del BDNF, así como determinados circuitos nerviosos tales como los circuitos de recompensa y de miedo (Wu *et al.*, 2013). Todos estos factores parecen contribuir en mayor o menor medida en el desarrollo de un fenotipo resiliente. No obstante, actualmente todavía no se conocen bien los mecanismos que subyacen a la resiliencia, ni se han identificado en detalle los factores de riesgo y protectores así como las interacciones que se establecen entre los mismos. Es necesario investigar en este campo para poder aplicar intervenciones que potencien este proceso, reduciendo los efectos deletéreos que una respuesta inadecuada al estrés induce en la salud del individuo.

Otro de los factores que pueden influir en la respuesta al estrés sería la **hormesis**. Ésta se puede definir como el proceso en el que la exposición a bajas dosis de un agente químico o ambiental que es dañino en altas cantidades, induce mecanismos de adaptación en la célula o en el organismo que finalmente resultan en efectos beneficiosos para el mismo (Mattson, 2008). De este modo, la exposición continuada a bajas cantidades o dosis de agentes dañinos como la radiación, la restricción calórica, el calor o compuestos oxidantes desencadenaría inicialmente en el organismo, y especialmente en los sistemas reguladores, toda una serie de mecanismos que producirían un deterioro de la homeocinesis para, posteriormente, activarse otros mecanismos compensatorios encargados de reparar y mantener los procesos biológicos fomentándose la tolerancia a dicho estrés. Así, finalmente, estos agentes dañinos a bajas dosis terminarían induciendo un efecto beneficioso sobre la salud, incluso llegando a aumentar la longevidad del individuo (Rattan, 2008). Numerosos trabajos han propuestos

diversos agentes estresantes que pueden inducir procesos horméticos, que reciben el nombre de hormetinas. Una hormetina se define como cualquier condición que puede inducir efectos horméticos en la fisiología de un individuo a través de la activación de las vías que participan en la respuesta al estrés, y se pueden clasificar en función de su naturaleza en: 1) hormetinas físicas, como el calor, la radiación o el ejercicio; 2) biológicas y nutricionales, incluyendo procesos infecciosos o los nutrientes; y 3) psicológicas, como procesos que suponen desafíos mentales (Rattan y Demirovic, 2009). A pesar de que el estudio de la hormesis ha avanzado en los últimos años, los mecanismos subyacentes a este proceso no se conocen aún con claridad (Vaiserman, 2010; De la Fuente *et al.*, 2011).

La **ansiedad**, que se podría definir como un estado psicológico y fisiológico en animales y humanos inducido por una amenaza y que se desencadena para asegurar la supervivencia del individuo (Steimer, 2002). Por tanto, desde el punto de vista evolutivo, la ansiedad sería beneficiosa tanto en cuanto permite que el sujeto se encuentre en estado de alerta ante posibles amenazas para así iniciar respuestas cognitivas, somáticas, emocionales y comportamentales con el objetivo de evitar sufrir cualquier daño y, por tanto, aumentar las posibilidades de sobrevivir. No obstante, si un individuo responde con altos niveles de ansiedad a cualquier cambio en su entorno (interno o externo) o bien este estado se mantiene a lo largo del tiempo (ansiedad patológica), sus respuestas a las situaciones estresantes que suceden en el día a día, inocuas para un sujeto “normal”, se verían alteradas, pudiendo llegar a afectar a su estado de salud.

### **1.3.4. Un modelo de envejecimiento prematuro natural en ratón basado en una inadecuada respuesta al estrés: los PAM (*Prematurely Aging Mice*)**

Una inadecuada respuesta al estrés conlleva un deterioro del funcionamiento del organismo y, particularmente de sus sistemas reguladores, interrumpiéndose la comunicación psiconeuroinmuno-endocrina y aumentando la morbilidad y mortalidad. De hecho, algunos autores han demostrado en roedores que la esperanza de vida del individuo se encuentra inversamente relacionada con la intensidad de sus respuestas conductuales y neuroendocrinas al ser expuestos a estímulos estresantes como lo es el realizar una prueba de exploración (Dellu *et al.*, 1994), y que esa menor longevidad media sería consecuencia de una aceleración de procesos neurodegenerativos asociados con la edad (Gilad y Gilad, 2000). Además, con el



envejecimiento se produce un deterioro de los sistemas implicados en las respuestas al estrés, lo que hace que los individuos de edades avanzadas no respondan adecuadamente a situaciones estresantes y, bajo estas condiciones, verían agravado su estado de salud (Cruces *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta las relaciones existentes entre una inapropiada respuesta al estrés, el envejecimiento y la longevidad, nuestro grupo de investigación viene profundizando, desde hace años, en un modelo de envejecimiento prematuro natural en ratón basado en el hallazgo de diferencias conductuales manifestadas por los animales al enfrentarse a una ambiente novedoso y, por tanto, estresante: la prueba de exploración conocida como “laberinto T” (Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Viveros *et al.*, 2007). Estas diferencias conductuales radican en que, dentro de una población aparentemente normal de ratones adultos o jóvenes sometidos al “laberinto T”, algunos individuos tardan más tiempo en realizar dicha prueba, llegando a mostrar conductas que indican una respuesta inadecuada al estrés como son las conductas de inmovilización o congelación. Estudios posteriores, demostraron que estos animales manifiestan cambios conductuales, neurológicos, endocrinos e inmunitarios similares a los observados en ratones cronológicamente viejos, así como una menor esperanza de vida que aquellos congéneres o compañeros de igual cepa, sexo y edad que realizan la prueba del “laberinto T” en menos tiempo y tienen, por tanto, una adecuada respuesta al estrés (Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013). Habida cuenta que las alteraciones anteriormente citadas ya se manifiestan en estos ratones en edades tempranas, junto con el hecho de que presentan una esperanza de vida menor, se demuestra que estos animales presentan un envejecimiento prematuro por los que se les denominó **ratones prematuramente envejecidos** o **PAM** (del inglés, *Prematurely Aging Mice*). Por el contrario, aquellos animales de igual edad cronológica que responden adecuadamente a la prueba y que no muestran dichas alteraciones ni mueren antes, se denominaron **ratones no prematuramente envejecidos** o **NPAM** (del inglés, *Non Prematurely Aging Mice*). Este modelo ha podido ser detectado en ratones de diferentes cepas, como ICR-CD1 y BALB/c, y tanto en machos como en hembras.

Con respecto a las **alteraciones conductuales**, los PAM manifiestan un deterioro de capacidades sensoriomotoras tales como

el vigor neuromuscular y la coordinación motora, una menor actividad locomotora o exploratoria, así como una mayor emotividad y ansiedad en comparación con los NPAM de su misma edad cronológica (Viveros *et al.*, 2001; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Hernández, 2016). Además de estas alteraciones comportamentales, los PAM también muestran **alteraciones neuroendocrinas y neuroquímicas** como mayores concentraciones basales de corticosterona o alteraciones en niveles de monoaminas en distintas regiones cerebrales en comparación con los NPAM (De la Fuente *et al.*, 2003; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005).

Así mismo, los PAM también se caracterizan por mostrar una **inmunosenescencia** prematura. Así, los estudios inmunitarios realizados en los PAM han demostrado que los leucocitos de estos animales manifiestan, en general, una mayor capacidad de adherencia y una menor quimiotaxis de macrófagos y linfocitos, menores capacidades fagocítica y microbicida de los macrófagos, una más baja respuesta proliferativa de los linfocitos a mitógenos (ConA y LPS) así como una menor actividad citotóxica NK y de liberación de IL1 $\beta$  e IL2 con respecto a los NPAM (Viveros *et al.*, 2001; Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Guayerbas *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; De la Fuente, 2010; Martínez de Toda *et al.*, 2016).

Una gran variedad de parámetros de **estrés oxidativo e inflamación** han sido analizados en los PAM. Así, los PAM mostrando mayores cantidades de compuestos inflamatorios, como el TNF $\alpha$ , y la prostaglandina E2 (PGE2) que los NPAM (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b). También en los PAM se observaron mayores cantidades de oxidantes en los leucocitos (anión superóxido extracelular, óxido nítrico, GSSG, el cociente GSSG/GSH y la actividad de la enzima XO) junto con menores de las defensas anti-oxidantes (GSH o las actividades de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa), en comparación con los NPAM (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013). Estos resultados apuntan a que los leucocitos de los PAM padecen un estrés oxidativo mantenido, causante del daño por oxidación en sus biomoléculas. Consecuentemente, los PAM muestran unos altos niveles de malonil-dialdehído (MDA) y de 8-oxodG (8-oxo,7,8-dihidro-2'-deoxyguanosina), relacionados con el daño oxidativo a lípidos y DNA nucleico, respectivamente, con respecto a los NPAM (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b).

Por lo tanto, en estos ratones prematuramente envejecidos ya en edades tempranas se establece un estrés oxidativo e inflamatorio en sus leucocitos, y otros tejidos, característico de ratones viejos, que subyacerían al deterioro funcional de sus sistemas reguladores. Todos estos hallazgos indicarían que los PAM muestran una mayor edad biológica que los NPAM de igual edad cronológica y de ahí que presenten una esperanza de vida más corta (Viveros *et al.*, 2007; De la Fuente y Miquel, 2009).

### **1.4. SITUACIONES QUE ACELERAN EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO: AISLAMIENTO SOCIAL/SOLEDAD Y SEPARACIÓN MATERNA.**

El mantenimiento de un adecuado estado de salud tanto físico como mental depende, como ya se ha mencionado anteriormente, del correcto funcionamiento de los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario) así como de la comunicación entre ellos (Blalock, 1989; Besedovsky y Del Rey, 1996; 2007). En base a la bidireccionalidad de dicha comunicación, cualquier estímulo que afecta a uno de los sistemas homeocinéticos, se reflejará en los otros. Así, factores negativos que afectan al sistema nervioso y endocrino, como el estrés emocional o la ansiedad también inducen cambios en el sistema inmunitario, deteriorando la homeocinesis y favoreciendo la aparición de patologías (Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010; Arranz *et al.*, 2007). De hecho, en el contexto de la comunicación psiconeuroinmuno-endocrina, se ha descrito que individuos que padecen ansiedad y una inadecuada respuesta al estrés muestran un estrés oxidativo e inflamatorio exacerbado y mantenido, que conlleva un deterioro de la función de los sistemas reguladores similar a la observada en el envejecimiento. Estas alteraciones, en última instancia, acelerarían la velocidad a la que estos individuos envejecen, mostrando una mayor edad biológica, acortando su esperanza de vida (Vida *et al.*, 2014).

Las especies sociales, como los roedores o el ser humano, se caracterizan por vivir en grupos que aseguran la supervivencia de los individuos al proteger a los mismos de las amenazas del entorno, lo que contribuye, por tanto, a su éxito reproductivo. De hecho, a lo largo de la evolución, se han desarrollado en los animales sociales cambios genéticos, moleculares, celulares y conductuales con el objetivo de mantener esta organización social. Así, el establecimiento y mantenimiento de estos grupos sociales en estas especies promovería el correcto funcionamiento de los sistemas reguladores, ayudando a mantener el equilibrio homeocinético y, por tanto, un buen estado de

salud. De hecho, diversos estudios han demostrado que el establecimiento de fuertes lazos sociales entre sujetos de estas especies se relaciona con una mejor función de los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario así como con un aumento de su esperanza de vida (House *et al.*, 1988; Lillard y Waite, 1995; Lee y Robbins, 1998; Kiecolt-Glaser y Newton, 2001; Townsend y McWhirther, 2005). Por el contrario, la pérdida de relaciones sociales podría tener consecuencias deletéreas sobre los sistemas reguladores, alterando la comunicación existente entre ellos y, por tanto, induciendo la pérdida de la homeostasis y la aparición de gran variedad de patologías. Así, el aislamiento social y la soledad se han relacionado con alteraciones del sistema cardiovascular (Cacioppo *et al.*, 2002; Hawkley *et al.*, 2006), un aumento de la actividad del eje HHA (Adam *et al.*, 2006) y una pérdida de la regulación por parte de los GC (Hawkley *et al.*, 2012). También, con alteraciones del sueño (Cacioppo *et al.*, 2002; Adam *et al.*, 2006; Hawkley *et al.*, 2010), un menor control de la inflamación, alteraciones de las respuestas inmunitarias (Cole *et al.*, 2007; Cole, 2008; Arranz *et al.*, 2009b) así como déficits conductuales, cognitivos o de atención (Arranz *et al.*, 2009b; Cacioppo y Hawkley, 2009). De acuerdo con esta idea, el aislamiento social y la soledad se consideran importantes factores de riesgo de morbilidad y mortalidad en las especies sociales (House, 1988).

Estas manifestaciones, que se asemejan a las observadas en individuos sometidos a estrés psicológico, apoyan que tanto el aislamiento social como la soledad puedan ser considerados unos potentes factores estresantes emocionales, que podrían acelerar la velocidad de envejecimiento de los sujetos que los padecen y acortar su longevidad. Además, la vulnerabilidad a padecer aislamiento social y soledad se incrementaría en la vejez. En la sociedad actual, los sujetos de edad avanzada pueden sufrir una pérdida de lazos sociales por el fallecimiento de la pareja o de parientes cercanos y amigos así como por la dificultad para establecer y mantener relaciones sociales de calidad. En este sentido, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Estadístico (INE) en el año 2011 indicó que el 22% de la población de personas de edad avanzada (mayores de 65 años) vivían solos en España de los cuales un 59% habían afirmado sentirse solos o aislados. Así, si tanto el envejecimiento como el aislamiento social y la soledad suponen una alteración de la comunicación entre los sistemas reguladores y, consecuentemente, una pérdida de la salud (De la Fuente, 2008), sentirse solo o sufrir de aislamiento en las últimas

etapas de la vida agravaría el deterioro neuroendocrino e inmunitario asociado con la edad.

### **1.4.1. Soledad vs aislamiento social. La importancia de los modelos animales de aislamiento social.**

La soledad y el aislamiento social pueden ser factores estresantes de tipo psicológico en el ser humano, pero con claras diferencias. Así, el primero se considera un sentimiento subjetivo (“sentirse solo”) mientras que el segundo es un estado objetivo que refiere que el individuo carece de contactos sociales (cónyuge, familia, amigos, etc.). El concepto de soledad se define como una “enfermedad persistente y crónica que carece de características positivas”. Dado que se trata de un sentimiento subjetivo, un individuo puede sentirse solo en una multitud o bien sentirse completo viviendo aislado. Por lo tanto, es la soledad no elegida por el individuo, esto es, el “sentirse solo”, lo que genera un estrés psicológico que altera el estado de salud, si bien los mecanismos que subyacen a estas alteraciones aún no están dilucidados. No obstante, si bien la soledad y el aislamiento social no son términos iguales, ambos parecen ejercer efectos similares aumentando la susceptibilidad a padecer enfermedades.

Por otro lado, teniendo en cuenta la esperanza de vida del ser humano y la dificultad para determinar cuándo una persona se siente realmente sola, el desarrollo de modelos animales de aislamiento social en especies sociales, como los roedores, constituirían una herramienta esencial para estudiar los efectos del aislamiento sobre los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario así como sobre la comunicación psiconeuroinmunoendocrina. Además, la corta esperanza de vida de los roedores, en comparación con la humana, permitiría estudiar los efectos de este estrés psicológico sobre la longevidad del individuo.

Si bien parece improbable detectar si un roedor se siente solo, los ratones y ratas que viven solos (estabulados individualmente, apartados de sus congéneres) manifiestan cambios similares a los observados en personas que sufren de soledad, los cuales se comentarán seguidamente, padeciendo así mismo un deterioro de su estado de salud.

### **1.4.2. Efectos del aislamiento social/soledad sobre los sistemas nervioso y endocrino**

Como se ha mencionado en el anterior apartado, el estrés psicológico ejerce toda una serie de alteraciones en el sistema neuroendocrino y, particularmente, en la actividad del eje HHA. Teniendo en cuenta que el aislamiento social y la soledad se consideran potentes factores estresantes psicológicos, éstos también ejercerán cambios no sólo en este eje sino también de tipo conductual y cognitivo.

#### ***Efectos del aislamiento social/la soledad sobre los ejes HHA y SAM***

A pesar de tratarse de un estrés psicológico, el aislamiento social no siempre induce una alteración de los niveles de ACTH y GC, existiendo resultados controvertidos a este respecto. Así, si bien en numerosos estudios no se ha observado cambios en las concentraciones basales de glucocorticoides en animales aislados con respecto a los estabulados en grupo (Viveros *et al.*, 1988; Scaccianoce *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009), otros autores sí los han detectado, en unos casos son mayores (Giralt y Armario, 1989; Miachon *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 2004) y en otros menores (Miachon *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1998; Djordjevic *et al.*, 2010) en los individuos aislados socialmente. Estas controversias acerca de la respuesta del eje HHA al aislamiento social podrían ser consecuencia de la duración del mismo. De esta manera, ratones sometidos a aislamiento social, manifiestan mayores concentraciones basales de corticosterona transcurrida una semana en estas condiciones de estabulación (Miyashita *et al.*, 2006), concentraciones que posteriormente (tras 13 semanas de aislamiento) son significativamente menores que las detectadas en los animales estabulados en grupo (Sakakibara *et al.*, 2012). Cabe mencionar que los efectos del aislamiento sobre el eje HHA no sólo se verán influenciados por la duración del estrés, sino que también pueden modificarse en función del sexo de los animales. Así, algunos autores han observado que ratones hembra sometidas a aislamiento social muestran menores cantidades de corticosterona con respecto a los individuos conviviendo en grupo, mientras que dichas diferencias no se detectaron en los ratones machos (Arndt *et al.*, 2009). Por su parte, el aislamiento social parece conllevar una menor capacidad para responder adecuadamente a factores estresantes. En este sentido, si bien también existen resultados contradictorios acerca de cómo varían las cantidades de ACTH o corticosterona liberadas en respuesta a un estrés en animales aislados, la mayoría de los estudios apuntan a que se produce un

aumento de las mismas (Giralt y Armario, 1989; Gambardella *et al.*, 1994; Toth *et al.*, 2011), indicando una excesiva reactividad al estrés en estos individuos. Además, la expresión de los receptores GR y MR, en el cerebro no parece verse afectada en animales sometidos a aislamiento, por lo que se ha postulado que esa mayor reactividad a situaciones estresantes manifestada por los individuos aislados podría deberse, al menos en parte, a una alteración del *feed-back* inhibitor mediado por los GC en la actividad del eje HHA (Holson *et al.*, 1991; Weiss *et al.*, 2004). Con respecto a la soledad, y de forma similar al aislamiento social, ésta se ha relacionado con unas mayores cantidades de cortisol (Adam *et al.*, 2006; Doane y Adam, 2010) así como con alteraciones de la respuesta de GC a situaciones estresantes (Steptoe *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2007; Hackett *et al.*, 2012).

Por otro lado, muy pocos estudios han abordado los efectos del aislamiento social en el eje SAM. Algunos autores han observado un mayor peso de las glándulas adrenales en animales aislados (Hatch *et al.*, 1963; Holson *et al.*, 1988), existiendo también dimorfismo sexual en este parámetro, ya que se ha descrito que este mayor peso de las glándulas adrenales parece más notable en las hembras aisladas socialmente que en los machos (Hatch *et al.*, 1965; Brain y Benton, 1979). Así mismo, en ratas aisladas crónicamente, también se han descrito mayores concentraciones plasmáticas de adrenalina y noradrenalina, lo cual se acompaña de menores niveles de las enzimas encargadas de la síntesis de CA en el bazo (Gavrilovic *et al.*, 2010), resultados que sugieren que el aislamiento social podría atenuar la síntesis de CA.

En conclusión, el aislamiento social sí parece afectar el funcionamiento del eje HHA, si bien estos efectos neuroendocrinos se verían fuertemente influenciados por factores como la edad, el sexo, la especie y la duración del aislamiento. Factores a considerar, por tanto, en los estudios de aislamiento social. Por el contrario, los efectos del aislamiento sobre el eje SAM y las respuestas al estrés siguen sin estar del todo clarificados.

### ***Efectos del aislamiento social sobre la conducta y funciones cognitivas***

Los efectos del aislamiento social sobre la conducta han sido largamente estudiados. Estas alteraciones conductuales incluyen síntomas relacionados con la depresión y un aumento de las conductas agresivas en los animales aislados (Parmigiani *et al.*, 1999; Mathews *et*

*al.*, 2008; Martin y Brown, 2010; Bourke y Neigh, 2011). Además, estas modificaciones observadas parecen estar claramente influenciadas por el sexo. Así, cuando los ratones macho conviven en grupo en la misma jaula, manifiestan las típicas conductas territoriales y de agresión entre individuos (Van Loo *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2008) así como un aumento de las respuestas de ansiedad y de concentraciones basales de corticosterona (Rodgers y Cole, 1993; Palanza *et al.*, 2001; Moragrega *et al.*, 2003). Por el contrario, las hembras que conviven en grupo no muestran las conductas anteriormente mencionadas, mientras que se ha descrito en ratones hembra que viven en condiciones de aislamiento social un aumento de las conductas de ansiedad y menores cantidades basales de corticosterona en relación a las hembras que viven agrupadas (Brown y Grunberg, 1995; Palanza *et al.*, 2001; Arndt *et al.*, 2009;). Atendiendo a los efectos del aislamiento social sobre las funciones cognitivas del individuo, éstos han sido menos estudiados que los ejercidos sobre la conducta. No obstante, algunos autores han observado déficits en funciones como el aprendizaje o la memoria de trabajo (Arranz *et al.*, 2009b; Huang *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2013).

### **1.4.3. Efectos del aislamiento social/la soledad sobre el sistema inmunitario**

La mayoría de autores aceptan que el aislamiento social induce una activación del eje HHA y del sistema autónomo simpático, lo que tiene como resultado un aumento de las concentraciones plasmáticas de GC, adrenalina y noradrenalina (Steptoe *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2009b; Ferland y Schrader, 2011), las denominadas hormonas del estrés, las cuales inducen cambios en la respuesta inmunitaria (CITAS). Si bien, como se ha comentado, la mayoría de los individuos aislados exhiben cantidades elevadas de GC en plasma, la cual presenta acciones inmunosupresoras y anti-inflamatorias, estos individuos desarrollan todo tipo de enfermedades de tipo inflamatorio tales como patologías cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer (Villano Bonamin *et al.*, 2001; Cacioppo y Hawkley, 2003; Townsend y McWhirther, 2005). Aunque estos hallazgos parecen contradictorios, algunos autores han observado que los leucocitos de personas crónicamente estresadas muestran *ex vivo* una resistencia a la acción de los GC en respuesta al LPS (Miller *et al.*, 2002; 2005). Esta observación sugiere que en el aislamiento social y la soledad podrían darse también un deterioro de la respuesta de los leucocitos frente a los GC, que favorecería el desarrollo del estrés



inflamatorio exacerbado y mantenido asociado con el estrés psicológico. Por su parte, dado que las CA también ejercen efectos sobre las células inmunitarias (Vizi Y Elenkov, 2002), las modificaciones en las cantidades de estas hormonas del estrés inducidos por el aislamiento social, y que ya han sido comentados anteriormente, también influirían en la respuesta inmunitaria frente al aislamiento. No obstante, aunque los efectos del aislamiento social y la soledad sobre el sistema inmunitario han sido poco estudiados, los mismos parecen ir más allá de las acciones inmunosupresoras de las moléculas neuroendocrinas que participan en la respuesta a este estrés psicológico.

### ***Cambios a nivel de la expresión génica en las células inmunitarias***

Los leucocitos de sangre periférica de personas aisladas o solas manifiestan un cambio en la expresión génica con respecto a individuos que no padecen soledad, existiendo una mayor expresión de genes de mediadores pro-inflamatorios, como los que participan en la activación del NF- $\kappa$ B, junto con una menor expresión de genes relacionados con la resistencia frente a infecciones víricas, la producción de anticuerpos y la maduración de linfocitos B (Cole *et al.*, 2007). Además, este cambio en el perfil de expresión génica debido a la soledad parece ser más evidente en las células presentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas y macrófagos, y en los linfocitos B (Cole *et al.*, 2011). Por tanto, la soledad parece inducir en los leucocitos cambios genéticos que podrían favorecer un estado de inflamación y una respuesta atenuada de las APC en los individuos que la padecen, lo cual contribuirían al deterioro de la respuesta inmunitaria.

### ***Cambios en la inmunidad innata y adquirida***

El hecho de que la soledad y, probablemente también el aislamiento social, favorezca la expresión de genes que contribuyen a un aumento de la inflamación de forma especial en los fagocitos y en las APC y los linfocitos B, apoyaría los hallazgos de que este estrés psicológico afecte al funcionamiento de ambas ramas del sistema inmunitario.

Aunque los linfocitos T y las células NK parecen menos sensibles a las alteraciones transcripcionales inducidas por el aislamiento social o la soledad, numerosos estudios han demostrado que el funcionamiento de estas células se deteriora ante un aislamiento

social, tanto en animales de experimentación como en humanos (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; 1984b; Wu *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2009b). Una inadecuada función de estas células, especialmente de las células NK, junto con el efecto inmunosupresor de los GC y la menor expresión de genes involucrados en la resistencia a infecciones (como el gen del IFN tipo I y genes relacionados con la producción de anticuerpos y la maduración de los linfocitos B) (Cole *et al.*, 2007; 2011) podrían explicar por qué los individuos aislados o que se sienten solos muestran un peor control de las infecciones por virus latentes así como una respuesta deficiente a vacunas (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; Glaser *et al.*, 1985; Dixon *et al.*, 2006; Jaremka *et al.*, 2013). Además, también se ha observado una menor capacidad proliferativa en respuesta a mitógenos en los linfocitos, tanto en los B frente al LPS (Wu *et al.*, 2000) como en los T en respuesta a ConA (Lu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000), en ratones aislados, y a PHA en humanos que experimentan soledad (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a).

### ***Cambios en las citoquinas***

Como factores o situaciones estresantes psicológicas, el aislamiento social y la soledad también inducirían un cambio en el equilibrio de citoquinas Th1/Th2, favoreciendo la respuesta Th2 en detrimento de la Th1. La soledad o el aislamiento social parecen provocar un aumento de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, al activar de forma preferente la vía del NF- $\kappa$ B (Cole *et al.*, 2007). Así, algunos autores han observado que ratones socialmente aislados manifiestan una mayor producción de la citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$  (Wu *et al.*, 1999; Möller *et al.*, 2013), y personas que experimentan soledad muestran mayores cantidades de mediadores pro-inflamatorios como la proteína C reactiva (37), IL6 y TNF $\alpha$  (Hackett *et al.*, 2012; Jaremka *et al.*, 2013).

#### **1.4.4. Efectos de la separación materna sobre los sistemas reguladores.**

Los cuidados maternos, especialmente en los mamíferos, establecen un vínculo social entre la madre y el hijo el cual es fundamental, desde el punto de vista evolutivo, ya que asegura la supervivencia de la cría o crías tras el destete y consecuentemente el éxito reproductivo. La interrupción de estos importantes lazos sociales supone un estrés que puede conllevar efectos negativos para la madre pero especialmente para las crías. De hecho, padecer estrés psicológico en las primeras etapas de la vida se ha asociado con una mayor

vulnerabilidad a desarrollar todo tipo de psicopatologías en etapas posteriores tales como depresión, ansiedad o psicosis (Penza *et al.*, 2003; Gutman y Nemeroff, 2003; Springer *et al.*, 2007; Faturi *et al.*, 2010). Dado que los primeros años de vida resultan cruciales en el desarrollo de los sistemas reguladores (Jankovic *et al.*, 1981), el padecer estrés a edades tempranas puede afectar a dicho desarrollo así como a la comunicación psiconeuroinmunoendocrina con los consecuentes efectos sobre la homeocinesis (Neveu *et al.*, 1994; Suchecki y Tufik, 1997; Gutman y Nemeroff, 2002; Teunis *et al.*, 2002; Meagher *et al.*, 2010).

Uno de los modelos desarrollados en animales de experimentación que mimetiza la experiencia de enfrentarse a adversidades o situaciones psicológicamente estresantes en las primeras etapas de la vida es la separación materna (Fone *et al.*, 2008; Nishi *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2015). Si bien ésta no se ajusta de forma estricta a un protocolo de aislamiento social, sí supone un fuerte estrés psicológico para la cría, que pierde el lazo social más importante durante la lactancia (fase fundamental del desarrollo en los mamíferos): la unión materno-filial. Por ello, la separación materna podría considerarse un modelo experimental de aislamiento social en la infancia. Los protocolos de separación materna se realizan o bien retirando a las crías de la jaula de crianza separándolas de la madre durante un tiempo determinado para luego devolverlas o bien retirando a la madre de dicha jaula. Sea como fuere, existe gran variedad de protocolos de separación materna en función de la edad de las crías, la duración de la separación o las condiciones de estabulación de las crías durante la misma, y esas variaciones podrían ser la causa de la existencia de resultados controvertidos encontrados en la literatura (Lehmann y Feldon, 2000).

### ***Cambios en los sistemas nervioso y endocrino***

Toda una serie de estudios han demostrado que la separación materna puede inducir cambios conductuales y cognitivos, además de claras alteraciones neuroendocrinas, particularmente en el eje HHA.

En lo que respecta a los efectos de la separación materna sobre la **conducta** y las **funciones cognitivas**, ésta parece inducir cambios neurobiológicos y conductuales que se mantienen en el tiempo y que se han llegado a denominar como “síndrome de aislamiento” (Hatch *et al.*, 1965; Valzelli, 1973). Dentro de las alteraciones conductuales se incluyen: la neofobia (Fone *et al.*, 1996), la tendencia al aislamiento

(Möller *et al.*, 2011), conductas perseverantes o repetitivas (Morgan y Einon, 1975), déficits sensoriomotores (Schubert *et al.*, 2009; Martin y Brown, 2010; Möller *et al.*, 2011; Möller *et al.*, 2013) y un aumento exacerbado de la locomoción (Levine *et al.*, 2007). Curiosamente, estas alteraciones conductuales, se asemejan a las observadas en individuos con esquizofrenia (Powell y Miyakawa, 2006; Fone *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2011). De hecho, estas modificaciones en la conducta de los animales sometidos a separación materna, junto con otras que afectan al desarrollo de circuitos neuronales y estructuras cerebrales (Fox, 2002) así como al sistema dopaminérgico (Heidbreder *et al.*, 2000; Möller *et al.*, 2013), y que también recuerdan a la esquizofrenia (Harvey *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2003; Harrison 2004b; Pantelis *et al.*, 2005), apoyan que el protocolo de separación materna sea un modelo animal válido para mimetizar esta enfermedad neuropsiquiátrica. A las alteraciones conductuales anteriormente citadas, también ha de añadirse que la separación materna induce un aumento de las respuestas de ansiedad (Weiss *et al.*, 2004; Lukkes *et al.*, 2009; Workman *et al.*, 2011; Stiller *et al.*, 2011; Ros-Simó y Valverde, 2012), que no se revierten tras la resocialización (Wright *et al.*, 1991), siendo las hembras más resilientes que los machos (Weiss *et al.*, 2004). Así mismo, también se ha descrito una relación entre la separación materna y el desarrollo de síntomas de depresión en la adolescencia y en la edad adulta (Sanchez *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2004; Fone y Porkess, 2008; Kuramochi y Nakamura, 2009), así como con aumento de la agresividad (Van Loo *et al.*, 2003; Hellemans *et al.*, 2004; Toth *et al.*, 2011). Dentro de los efectos de la separación materna sobre las **funciones cognitivas**, caben destacar que se han descrito déficits de memoria y aprendizaje (Schrijver *et al.*, 2004; Bianchi *et al.*, 2006), los cuales apoyan el que dicho protocolo constituya un modelo animal adecuado para el estudio de la esquizofrenia.

Con respecto a las alteraciones de la separación materna sobre el **eje HHA**, al igual que acontece con el aislamiento social y la soledad, existen numerosas contradicciones respecto a las concentraciones basales de ACTH o GC, habiéndose observado en los individuos criados en condiciones de aislamiento tanto mayores (Weiss *et al.*, 2004; Chida *et al.*, 2006; Workman *et al.*, 2011), como menores (Sanchez *et al.*, 1998; Hermes *et al.*, 2006; Ros-Simó y Valverde, 2012) e incluso ningún cambio (Holson *et al.*, 1991; Schrijver *et al.*, 2002; Scaccianoce *et al.*, 2006; Stiller *et al.*, 2011; Toth *et al.*, 2011) en dichas concentraciones. Así mismo, los animales sometidos a separación materna también han manifestado una alteración del mecanismo de

retroalimentación negativo sobre el eje HHA (Serra *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que los animales criados en aislamiento presentan una respuesta inadecuada a situaciones estresantes, dándose, no obstante, resultados bastante contradictorios ya que la actividad del eje HHA en estos individuos se ha observado aumentada (Holson *et al.*, 1991; Toth *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2004; Ros-Simó y Valverde, 2012), intacta (Holson *et al.*, 1988) o atenuada (Sanchez *et al.*, 1998; Lukkes *et al.*, 2009). Es más, dicha inadecuada respuesta al estrés podría depender del sexo de forma que las ratas machos manifiestan una mayor liberación de ACTH y corticosterona tras ser expuestos a un estrés, pero no las hembras (Olsson *et al.*, 2004).

### ***Cambios en el sistema inmunitario***

Como se ha comentado anteriormente, los efectos que ejerce la separación materna en roedores han hecho que tal separación se proponga como un buen modelo animal para el estudio de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia y otras patologías con base inflamatoria. Así mismo, en individuos que experimentan este tipo de estrés psicológico se han observado también alteraciones inmunitarias que parecen aumentar su vulnerabilidad a padecer enfermedades en edades más avanzadas. Así, al alcanzar la edad adulta, los individuos sometidos a separación materna manifiestan una mayor susceptibilidad a infecciones parasitarias y víricas (Barreau *et al.*, 2006; Meagher *et al.*, 2010), un aumento de la incidencia de tumores (Nakamura *et al.*, 2011) y una mayor vulnerabilidad a enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Teunis *et al.*, 2002; Ghia *et al.*, 2008; Faturi *et al.*, 2010).

Algunos estudios se han centrado en describir los efectos de la separación materna sobre la **inmunidad innata**, demostrando que ésta induce alteraciones en el funcionamiento de los fagocitos (neutrófilos y macrófagos). De esta forma, se ha observado que los fagocitos de animales sometidos a este estrés psicológico pueden mostrar un aumento o bien ningún cambio en su capacidad fagocítica, dependiendo de la cepa a estudiar (Pinheiro *et al.*, 2011), así como un estallido respiratorio exacerbado tras ser estimulados con diversos compuestos (Teunis *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2011). Así mismo, la separación materna también induce efectos negativos en la actividad de las células NK, comprometiendo esta acción citotóxica incluso a lo largo de la vida de los animales (Lubach *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2011). Con respecto a la **inmunidad adquirida**, los linfocitos T y B de individuos sometidos a separación materna manifiestan una menor

capacidad para proliferar en respuesta a mitógenos (Laudenslager *et al.*, 1982; Ackerman *et al.*, 1988; Lubach *et al.*, 1995).

Nuestro grupo de investigación también ha estudiado los efectos de un protocolo de separación materna en rata sobre diversas funciones (quimiotaxis, respuesta proliferativa a mitógenos y actividad NK) de leucocitos de timo, bazo y nódulos axilares. Este protocolo consistió en separar a las crías de la madre durante 24 horas, entre los días 9 y 10 tras el nacimiento, realizándose las valoraciones inmunitarias en los días 13 (neonatos), 40 (adolescentes) y 75 (adultos) de edad. Los resultados mostraron que este protocolo de separación materna induce un deterioro de algunas de las funciones estudiadas ya en el periodo neonatal (13 días), que se mantuvo en la adolescencia e incluso en la edad adulta (Llorente *et al.*, 2007; De la Fuente *et al.*, 2009).

### ***Cambios en las citoquinas***

Además de los cambios neuroendocrinos y en la función inmunitaria, la separación materna también afecta a las cantidades de citoquinas, encontrándose valores mayores de las pro-inflamatorias, lo que podría subyacer al hecho de que los animales sometidos a este estrés psicológico en edades tempranas sean más vulnerables a enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Así, en diferentes protocolos de separación materna se han observado concentraciones elevadas de citoquinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  y de la citoquina reguladora IL2, así como bajas en el caso de la citoquina anti-inflamatoria IL10 (Barreau *et al.*, 2004; Danese *et al.*, 2007).

A pesar de dichas contradicciones, parece claro que la separación materna produce alteraciones de los sistemas reguladores, que pueden seguir manifestándose o incluso agravarse en la edad adulta, comprometiendo la salud del individuo más allá del periodo en el que padece ese estrés psicológico.

### **1.5. ESTRATEGIAS QUE RALENTIZAN EL ENVEJECIMIENTO**

Las sociedades desarrolladas están experimentando un notable ascenso de su esperanza de vida o longevidad media en los últimos años, gracias a las mejoras en los ámbitos socioeconómico y sanitario. Esto, junto con el descenso de la natalidad que sucede en estas sociedades, conlleva un envejecimiento considerable de las mismas.

Este aumento de la proporción de personas de edad avanzada supone, a su vez, un aumento de la frecuencia de enfermedades metabólicas y degenerativas asociadas con la edad. Por tanto, dentro de los objetivos que persigue la geriatría y la gerontología, uno de los más importantes es que los individuos consigan llevar a cabo un envejecimiento con un buen estado de salud y una buena calidad de vida, lo que en última instancia podría suponer una mayor longevidad saludable. Para ello se han desarrollado una gran variedad de intervenciones que intentan ralentizar la velocidad del envejecimiento, disminuyendo la edad biológica de los individuos, para así atenuar y retrasar el declive funcional que afecta a todos los niveles de organización del organismo.

Dado que al envejecer se establece un estrés oxidativo e inflamatorio crónicos u *oxi-inflamm-aging*, que afecta de forma especial a los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario) (De la Fuente y Miquel, 2009), la mayoría de las intervenciones o estrategias para ralentizar el envejecimiento se encaminan a disminuir esta oxidación e inflamación crónicas y a aumentar el control sobre estos procesos, actuando particularmente sobre los sistemas reguladores. Con ello, se pretende conseguir mantener un adecuado funcionamiento de estos sistemas y de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina, asegurando una adecuada homeocinesis y, por tanto, de un buen estado de salud. En este sentido se han desarrollado toda una serie de estrategias, tanto en animales de experimentación como en el ser humano, basadas en cambios en el estilo de vida o en el ambiente del individuo, que han resultado eficaces para ralentizar su envejecimiento e incluso aumentar la longevidad media.

Un tipo de estrategias son las **nutricionales**, dentro de las cuales destacarían 1) la **restricción calórica**, especialmente proteica y del aminoácido metionina, que actúa disminuyendo la tasa de producción de ROS mitocondriales, ralentizando la senescencia y alargando la longevidad (Heilbronn y Ravussin, 2003; Sanz *et al.*, 2004; Gredilla y Barja, 2005; Sanz *et al.*, 2006; Sánchez-Román Y Barja, 2013; Lee y Longo, 2016); 2) la suplementación en la dieta con cantidades adecuadas de **antioxidantes**, intervención estudiada también en nuestro laboratorio, que favorece el mantenimiento de un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes disminuyendo la velocidad de envejecimiento y el declive fisiológico y patológico asociado al mismo (Hasnis y Reznick, 2003; De la Fuente y Giménez-Llort, 2010; De la Fuente *et al.*, 2011; Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2014; Conti *et al.*, 2016). Otra intervención eficaz para atenuar los efectos deletéreos del

envejecimiento es el **ejercicio físico moderado** practicado de forma habitual, que también ha demostrado ejercer efectos beneficiosos sobre los sistemas reguladores, mejorando su funcionalidad (De la Fuente *et al.*, 2005; De la Fuente *et al.*, 2011; Hamilton y Rhodes, 2015; Viña *et al.*, 2016); 3) la **hormesis**, que se ha comentado anteriormente, también se ha propuesto en los últimos años como una intervención válida para lograr un envejecimiento saludable, de manera que la aplicación de estreses de baja o media intensidad activaría mecanismos de protección que se traducen en efectos beneficiosos para el organismo, incluyendo a los sistemas reguladores (Calabrese, 2002; Rattan, 2008; De la Fuente *et al.*, 2011; Calabrese *et al.*, 2015). De hecho, entre los mecanismos que subyacen a los efectos beneficiosos de muchas de las intervenciones empleadas para ralentizar el envejecimiento, alcanzar una vejez saludable e incluso aumentar la longevidad podrían incluirse procesos horméticos.

### 1.5.1. Estrategias de enriquecimiento ambiental

El Enriquecimiento Ambiental (EA) se puede definir como la aproximación experimental llevada a cabo en modelos animales que mimetiza el mantenimiento de una vida activa a nivel mental, físico y social en los humanos. De hecho, la capacidad del EA para conservar adecuadamente las capacidades mentales y conductuales así como fisiológicas de los individuos es ampliamente reconocida. En general, los efectos positivos del EA sobre el organismo son consecuencia de las modificaciones moleculares, celulares y funcionales que ejerce esta intervención y que, finalmente, se traducen en un mejor estado de salud de los sujetos sometidos a ella. Numerosos estudios han demostrado los beneficios del EA en el envejecimiento, siendo una estrategia eficaz para revertir el deterioro neurológico y cognitivo así como inmunitario que se produce con la edad (Mattson *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Arranz *et al.*, 2010c; Mora, 2013). Los efectos positivos del EA en la vejez, particularmente sobre los sistemas reguladores, asegurarían el mantenimiento de la homeostasis permitiendo alcanzar una longevidad saludable.

Dentro de los protocolos de EA, el más empleado en roedores consiste en estabular a los individuos en grupo (dado que son especies sociales) e introducir en su ambiente diversos objetos (ruedas de actividad, túneles, escaleras, etc.), que se pueden variar de posición periódicamente, induciendo una estimulación sensorial, cognitiva, motora e incluso social continuada (Van Praag *et al.*, 2000; Nithianantharajan y Hannan, 2006). Además, estos objetos también



pueden promover que el animal lleve a cabo un ejercicio físico moderado y continuado, con sus consecuentes beneficios sobre la salud. Así mismo, la estabulación en grupo en estas especies sociales incrementaría las interacciones social, beneficiosas para las especies sociales.

Los efectos a nivel neurológico y conductual del EA así como sobre la actividad del eje HHA han sido largamente estudiados. Con respecto a los **efectos conductuales y neurológicos**, se ha observado que el EA mejora funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Van Praag *et al.*, 2000), previniendo el declive cognitivo asociado con la edad (Mora *et al.*, 2007; Mora, 2013) y revirtiendo, en modelos animales, algunas de las consecuencias negativas de enfermedades neurodegenerativas (Mora, 2013). De hecho, se ha descrito que la exposición a EA fomenta la plasticidad cerebral y los procesos de neurogénesis, particularmente en el hipocampo y en la corteza cerebral (Van Praag *et al.*, 2000; Kempermann *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2007; Schloesser *et al.*, 2010), y de este modo puede mejorar las funciones cognitivas. Todos estos efectos positivos podrían estar mediados por el incremento de la producción y expresión de diversos factores neurotróficos, como el BDNF o el NFG (del inglés, *Nerve Growth Factor*), que se induce por la exposición a un ambiente enriquecido (Kazlauckas *et al.*, 2011). Además, los animales sometidos a EA también manifiestan una menor emotividad, mostrando mejores respuestas ante estímulos estresantes y reducidas conductas de ansiedad así como un aumento de la actividad exploratoria (Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014). Algunos autores han propuesto que estos beneficios sobre la conducta de los animales sometidos a ambientes enriquecidos radicarían en un aumento de la expresión de GC en el hipocampo, lo que proporcionaría mayor eficacia al mecanismo de retroalimentación negativo sobre el eje HHA (Mohammed *et al.*, 1993; Olsson *et al.*, 1994; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014). No obstante, los estudios de los efectos del EA sobre los GC y, por tanto sobre el **eje HHA**, ofrecen resultados contradictorios. Así, algunos trabajos no han hallado ningún cambio en las concentraciones basales de corticosterona en los animales sometidos a EA (Pham *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2001) mientras que en otros se han descrito aumentos de las mismas (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Moncek *et al.*, 2004) e incluso disminuciones (Mohammed *et al.*, 1993; Larsson *et al.*, 2002). También se han observado menores cantidades de GC en respuesta a situaciones estresantes (Roy *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2002; Welberg

*et al.*, 2006). Además, algunos autores han propuesto que el EA podría inducir una disminución del estrés oxidativo en cerebro, lo que podría también influir en la consecución de un mejor sistema neuroendocrino (Fernández *et al.*, 2004; Muhammad *et al.*, 2017).

Si los efectos beneficiosos del EA sobre el sistema neuroendocrino son evidentes, en la **función del sistema inmunitario**, también parecen serlo, aunque este es un aspecto poco estudiado. En este contexto, algunos trabajos, incluyendo los llevados por nuestro grupo de investigación, han demostrado que el EA produce una mejora de diversos parámetros inmunitarios, tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, (Benaroya-Milshstein *et al.*, 2004; 2007; Arranz *et al.*, 2010c) además de disminuir los oxidantes y aumentar los antioxidantes en los leucocitos, asegurando el mantenimiento de un adecuado equilibrio redox, básico para el funcionamiento de esta células (Arranz *et al.*, 2010c). De hecho, el estudio llevado a cabo por Arranz *et al.* (2010c) demostró que el EA es una estrategia eficaz para revertir la inmunosenescencia en ratón. Además, dicho trabajo también demostró que el EA aumenta la longevidad de los individuos que han sido expuestos a un ambiente enriquecido desde la edad adulta (Arranz *et al.*, 2010c), resultado que concuerda con los obtenidos por otros autores (Bell *et al.*, 2009).

### ***La hidroterapia como una nueva estrategia de EA***

La hidroterapia o el tratamiento con baños, que consiste en bañar a los individuos en agua (que puede ser normal o mineralo-medicinal) caliente, se podría ajustar a la definición del EA que se ha indicado, por lo que nuestro grupo de investigación la ha propuesto como una nueva estrategia de EA (De la Fuente *et al.*, 2011). Desde tiempos remotos, el ser humano ha utilizado el agua como un recurso terapéutico para aliviar sus enfermedades, incluyendo las mentales, datándose la primera referencia sobre dicho uso en el siglo V a.C., cuando Hipócrates recomendaba el agua fría como sedante y para tratar la melancolía. A pesar de que la hidroterapia es uno de los métodos más antiguos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, sus efectos sobre el organismo han sido muy poco estudiados, limitándose a trabajos en los que esta intervención se emplea para paliar el dolor y la severidad de los síntomas de enfermedades inflamatorias que afectan al tejido óseo y muscular y a las articulaciones, como la osteoartritis o la lumbalgia (Karagülle y Karagülle, 2015; Forestier *et al.*, 2016), o en medicina rehabilitadora (Beer y Jobst, 2016).

Muchos de los efectos beneficiosos de la hidroterapia podrían deberse a que ejerce un estrés, principalmente en roedores dado que no es su medio natural, con consecuencias sobre el **eje HHA**. Así, Kuczera y Kokot (1996) tras aplicar un tratamiento de “spa” en pacientes con diversas patologías, observaron un aumento de la concentración de ACTH y cortisol, además de GH y prolactina. Otro mecanismo que podría subyacer y contribuir a los beneficios de la hidroterapia sobre el estado de salud es la hormesis que pudiera inducir sobre el organismo, dado que puede considerarse como un factor estresante para los roedores.

A pesar de todo lo anteriormente comentado, los efectos de la hidroterapia sobre parámetros conductuales y el sistema inmunitario, particularmente en la vejez, no han sido prácticamente analizados. En este sentido, nuestro grupo de investigación sometió a ratones hembras viejas a un tratamiento de baños con agua normal durante 2 semanas y los resultados de este estudio demostraron que dicha intervención revirtió el deterioro asociado con la edad de algunos de los parámetros conductuales y de función inmunitaria analizados (De la Fuente, *et al.*, 2011), lo que apoyaría que la hidroterapia fuese una potencial estrategia de EA para mejorar el envejecimiento. No obstante las consecuencias de esta intervención sobre muchos aspectos conductuales e inmunitarios así como en la longevidad de los individuos aún no son conocidos.

Los efectos de la hidroterapia pueden clasificarse en tres grupos (Nasermoaddeh y Kagamimori, 2005): 1) efectos mecánicos, ya que la presión hidrostática puede tener efectos beneficiosos sobre la circulación sanguínea y respiratoria e incluso mejorar el sentido del equilibrio y la movilidad (Bacaicoa San Martín, 2006); 2) efectos térmicos, dado que el baño se realiza con agua caliente, se produciría una vasodilatación vascular periférica, activándose la circulación sanguínea. Además también podría inducir una acción analgésica y sedante (Bacaicoa San Martín, 2006); y 3) efectos químicos, que vendrían determinados por la composición mineral del agua empleada, que les denomina y confiere una propiedades específicas (bicarbonatadas, sulfatadas, cloruradas, sódicas, cálcicas, magnésicas). A este último respecto, las aguas mineralo-medicinales que contienen azufre como componente principal se han usado desde tiempos remotos (Frosch, 2007). Los efectos terapéuticos de las aguas sulfuradas, que se conocen por las observaciones clínicas, incluyen efectos antirreumáticos, antialérgicos, desintoxicantes, anti-

inflamatorios o antipruriginosos (San Martín y Armiejo-Castro, 1994; Ghersetich y Lotti, 1996; Albertini *et al.*, 2008). Así mismo, también se ha propuesto que este tipo de aguas mineralo-medicinales podría mejorar el estado redox, habiéndose observado una disminución de marcadores de oxidación en individuos sometidos a hidroterapia con aguas ricas en sulfuros (Scheidleder *et al.*, 2000; Ekmekcioglu *et al.*, 2002; Leibetseder *et al.*, 2004; Hernández-Torres *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2009). Aunque prácticamente se desconocen los efectos de la hidroterapia con aguas mineralo-medicinales sulfuradas sobre la funcionalidad de los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario), especialmente en la vejez, los escasos resultados que se tienen al respecto ya apuntan a que estamos ante una estrategia con gran potencial para ralentizar el envejecimiento y contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud en la vejez.

### 1.5.2. Otras estrategias para ralentizar el envejecimiento

En los apartados anteriores de este bloque 5º de la Introducción se han comentado con mayor o menor detalle las estrategias más conocidas y utilizadas para ralentizar la velocidad a la que un individuo envejece, asegurando alcanzar un envejecimiento saludable e, incluso en algunos casos, alargando su esperanza de vida. No obstante, en la presente Tesis, nos propusimos explorar nuevas posibilidades de intervención que no se enmarcan en las que podían denominarse más tradicionales. En este sentido se han incluido la **ingestión de aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuro**, cuyos posibles efectos se han comentado en el apartado anterior, la administración de un nuevo producto registrado como **Nutrisim®**, el tratamiento con el fármaco **atenolol**, y la exposición a **nanopulsos**.

#### ***Efectos del Nutrisim®***

El Nutrisim© (Biosim Laboratory, México) está constituido por una mezcla de aminoácidos (lisina, arginina, colina), sales y minerales (cloruro de calcio, magnesio y amonio) (Romero-Dávalos *et al.*, 2011). Algunos de estos componentes podrían ejercer un efecto beneficioso en la conducta, la función y el estado redox de las células inmunitarias. Los estudios acerca de cómo podría este compuesto beneficiar a la salud son muy pocos, si bien en algunos de ellos se ha comprobado que induce un efecto positivo a nivel del sistema nervioso central así como en alguna patología en la que resulta implicado el sistema inmunitario (Romero-Dávalos *et al.*, 2011; Gonzalez-Renovato *et al.*, 2012;

Gonzalez-Renovato *et al.*, 2013; Torres-Sanchez *et al.*, 2013; Bitzer *et al.*, 2013; Velázquez-Brizuela *et al.*, 2014).

### ***Efectos del atenolol***

El atenolol es un bloqueante del receptor adrenérgico  $\beta_1$  que se ha utilizado frecuentemente en humanos durante las últimas décadas para tratar diversas patologías cardiovasculares. Se considera un fármaco seguro para la salud al no mostrar efectos secundarios significativos. Estudios previos han descrito como un tratamiento de corta duración con atenolol, dado en el agua de bebida, disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana en roedores (Sanchez-Roman *et al.*, 2010; Sánchez-Roman *et al.*, 2014). De igual forma, un tratamiento crónico con este fármaco también demostró en ratones viejos su eficacia para disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y la cantidad de grasa visceral, así como indujo un decremento de algunos marcadores de estrés oxidativo (Gómez *et al.*, 2014). En este contexto hay que considerar que tanto la tasa de producción de ROS mitocondriales como la composición de ácidos grasos insaturados de las membranas son dos parámetros que se relacionan con la longevidad. De hecho, animales (pájaros y mamíferos) longevos manifiestan una baja tasa de producción de ROS mitocondrial (Barja, 2013) y un bajo grado de insaturación en sus ácidos grasos de membrana (Pamplona *et al.*, 2002; Hulbert *et al.*, 2007; Naudi *et al.*, 2011). Los efectos del atenolol en el sistema nervioso, a nivel conductual, y en el inmunitario han sido muy poco estudiados, pero se ha comprobado que el tratamiento de larga duración con atenolol mejoró algunos parámetros conductuales y de función inmunitaria en los leucocitos esplénicos, si bien no modificó la longevidad de los animales (Gómez *et al.*, 2014).

### ***Efectos de los nanopulsos***

Los efectos en organismos vivos de la exposición a varias formas de energía electromagnética, han sido objeto de interés y también de debate durante muchas décadas (Sutbeyaz *et al.*, 2009; Sollazzo *et al.*, 2010 informe). Con respecto al sistema inmunitario, existen varios estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos sobre la función inmunitaria (Mooney *et al.*, 1986; Simko y Mattson, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006; Gomez-Ochoa *et al.*, 2010). Por su parte, un tratamiento con microondas indujo una mejora notable de varias funciones de leucocitos, incluyendo la adherencia, la fagocitosis de los macrófagos, los niveles de anión superóxido, la citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpos y la respuesta de proliferación de los linfocitos en presencia del mitógeno PHA (Zafra, 1985; Zafra *et al.*, 1998).

En la actualidad, las investigaciones en el campo de los efectos de la energía electromagnética sobre el organismo parecen estar más enfocadas a los nanopulsos. Un nanopulso electromagnético tiene un periodo de duración de 1 a 10 ns y se describe como un pulso de banda ultra-ancha. Este tipo de radiación se usa en varios tratamientos médicos (Beebe *et al.*, 2003; Schoenbach *et al.*, 2004; Beebe *et al.*, 2004; Tekle *et al.*, 2005; Nuccitelli *et al.*, 2006; Bojjawar *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2008). Se ha postulado que los efectos beneficiosos de los nanopulsos sobre las células radicarían en que éstos proporcionarían energía a las mismas, mejorando sus capacidades funcionales. Pero sus verdaderos efectos biológicos se conocen relativamente poco (Lu y de Lorge, 2008), por lo que se ha propuesto que dichos efectos deberían analizarse para conocer si carecen de efectos secundarios no deseados para la salud y asegurar su uso adecuado en terapias (Su *et al.*, 2009). No obstante, los efectos de los nanopulsos sobre la conducta y la función inmunitaria, especialmente en la vejez, no han sido estudiados.



# **Justificación y Objetivos**





En la actualidad se sabe que con el envejecimiento se producen cambios en los sistemas reguladores, el sistema nervioso, endocrino e inmunitario, así como alteraciones en la comunicación entre ellos (comunicación neuroinmunoendocrina). Dado el papel de estos sistemas en el mantenimiento de la homeostasis, o más correctamente en el mantenimiento de la homeocinesis del organismo, tales modificaciones conllevan un deterioro progresivo del estado de salud del individuo. Concretamente, en el sistema inmunitario, cuya capacidad funcional supone un excelente marcador del estado de salud, los cambios que experimenta este sistema al avanzar la edad y que se recogen bajo el nombre de inmunosenescencia, estarían implicadas en el aumento de la susceptibilidad a sufrir procesos infecciosos, autoinmunes, cánceres, y en la mayor severidad de los mismos, con los consecuentes efectos deletéreos sobre la salud del individuo. No obstante, a pesar de los avances en el conocimiento de la inmunosenescencia logrados hasta el momento, siguen hallándose en la literatura científica muchas lagunas y controversias al respecto. Por ello, y dado el envejecimiento de las sociedades actuales, se hace necesario profundizar en el conocimiento de los cambios que afectan al sistema inmunitario al avanzar la edad, aportando aproximaciones nuevas en el estudio de la inmunosenescencia. Ante la imposibilidad de hacer estudios longitudinales en humanos por su elevada longevidad, se requiere la utilización de animales de experimentación, como los ratones, y además obteniendo las células inmunitarias del peritoneo, sin sacrificar al animal, para poder llevar a cabo esas investigaciones. Así, las propiedades mecánicas de las células, como la capacidad de deformación de las mismas, desempeñarían un papel importante en la muchas funciones celulares (como la capacidad de migración), incluyendo las de los leucocitos. De hecho, esta capacidad de deformación (que depende de cambios que experimentan no sólo las membranas, sino también el citoesqueleto y el núcleo celulares), se ha propuesto como un biomarcador prometedor para indicar el estado funcional de la célula, tanto en el envejecimiento como en diversas patologías. No obstante, los efectos de la edad sobre la capacidad de deformación de las células inmunitarias y, más concretamente, sobre los linfocitos T está muy poco estudiado. Por su parte, las citoquinas

constituyen los principales mediadores de la interacción entre las células inmunitarias, estando implicadas en el desarrollo y la resolución de las respuestas inmunitarias, siendo también las responsables de múltiples funciones corporales. Si bien los cambios en las concentraciones de citoquinas que suceden al envejecer han sido largamente investigados, la mayoría de los estudios se han centrado en analizar las concentraciones de estos mediadores a nivel plasmático o bien las secretadas por determinadas subpoblaciones leucocitarias *in vitro*. Así mismo, muy pocos trabajos han abordado cómo varían las concentraciones de citoquinas intracelulares en las células inmunitarias con el envejecimiento. Y ninguno, al menos hasta nuestro conocimiento, ha estudiado la variación de estos mediadores en un grupo de individuos a lo largo de su vida. Teniendo en cuenta todo lo anterior, en la presente Tesis se planteó el siguiente **primer objetivo general**:

**1. Profundización y nuevas aproximaciones en el estudio de la inmunosenescencia en el envejecimiento cronológico en ratones.**

Que a su vez se subdividió en los siguientes objetivos parciales:

- 1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.**
- 1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.**

Una de las características del proceso de envejecimiento es su heterogeneidad, de manera que no todos los individuos pertenecientes a una misma especie envejecen a la misma velocidad. Es por ello que existen individuos que muestran, ya en su edad adulta, alteraciones neuroendocrinas e inmunitarias propias de la vejez, pudiéndose decir de ellos que se encuentran envejecidos prematuramente. Así, nuestro grupo de investigación viene caracterizando desde hace años un modelo de envejecimiento prematuro en ratones en el que los animales adultos con una inadecuada respuesta conductual a situaciones estresantes y unos elevados niveles de ansiedad muestran, además de

otras alteraciones conductuales y neurológicas, cambios en las funciones de las células inmunitarias y un mayor estrés oxidativo en las mismas, todos ellos característicos de animales viejos. El hecho de que estos animales presenten este envejecimiento fisiológico prematuro y de que, además, vivan menos en comparación con sus congéneres de similar edad cronológica, que no demuestran esa inadecuada respuesta al estrés, nos llevó a denominarlos *Prematurely Aging Mice* (PAM). Además, dado que la evolución de los cambios que suceden con el proceso de envejecimiento, particularmente en ciertos aspectos de los sistemas reguladores, sigue un patrón similar en ratón y humano, el desarrollo de este tipo de modelos murinos como los PAM resultaría muy útil para avanzar en el conocimiento de dicho proceso. No obstante, a pesar de los numerosos trabajos que se han llevado a cabo en los PAM por nuestro grupo de investigación, aún se desconocen muchos aspectos conductuales e inmunitarios en los mismos. Por todo ello, en la presente Tesis nos propusimos desarrollar este **segundo objetivo general**:

### **2. Profundización en parámetros conductuales e inmunitarios en ratones envejecidos prematuramente (PAM).**

El cual se subdividió en los siguientes Objetivos parciales:

#### **2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.**

#### **2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.**

La soledad o el aislamiento social, en especies sociales como la humana o los roedores, son considerados como un potente estrés emocional que, al igual que sucede con el envejecimiento, llevarían al deterioro del normal funcionamiento del organismo y, particularmente de los sistemas reguladores y de la comunicación entre ellos. De hecho, algunos autores consideran al aislamiento social y a la soledad como factores de riesgo de morbilidad y mortalidad en estas especies sociales. Los posibles efectos deletéreos del aislamiento y la soledad sobre la fisiología de los sistemas reguladores pueden afectar al individuo social en cualquiera de las etapas de su vida. No obstante es

en la infancia y especialmente en la vejez cuando resultan más perjudiciales, y es precisamente al avanzar la edad cuando aumenta la vulnerabilidad a sufrir estas situaciones, pudiendo actuar como aceleradores del proceso de senescencia. Esto puede afectar negativamente el estado de salud en las últimas etapas de la vida e incluso acortar la longevidad del individuo. No obstante, las características propias de cada sujeto (edad, sexo, resiliencia, respuesta emocional al estrés, niveles de ansiedad) podrían modificar los efectos negativos del aislamiento social o la soledad sobre el estado de salud. Por todo lo mencionado con anterioridad, nos propusimos desarrollar este **tercer objetivo general** en la presente Tesis:

### **3. Estudio de los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en modelos murinos a diferentes edades.**

Este objetivo, a su vez se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- 3.1. Efectos de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.**
- 3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo en ratas viejas macho.**
- 3.3. Efectos del aislamiento y la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad media en ratones viejos**
- 3.4. Efectos del aislamiento y la ansiedad sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad media.**

El envejecimiento es un proceso fisiológico inevitable pero también modulable. Por ello es posible diseñar intervenciones o estrategias con el fin de ralentizar sus efectos deletéreos sobre el organismo así como disminuir las probabilidades de padecer enfermedades asociadas con la edad. Entre estas intervenciones, una estrategia que viene adquiriendo interés en los últimos años sería el “enriquecimiento ambiental”, que se podría definir como una aproximación experimental en animales de experimentación al mantenimiento de una vida intelectual, física y social activa en humanos. Numerosos estudios han

demostrado los beneficios del enriquecimiento ambiental, mediante la introducción de objetos en las jaulas de estabulación, sobre los sistemas nervioso y endocrino pero muy pocos abordan los efectos que ejerce sobre el sistema inmunitario, y muchos menos sobre la esperanza de vida del individuo. En este sentido, nuestro grupo de investigación comprobó que este tipo de enriquecimiento ambiental “clásico” utilizando objetos, podría ser una buena estrategia para revertir la inmunosenescencia, pero que sólo los animales expuestos desde su edad adulta al ambiente enriquecido aumentaban su esperanza de vida. Dados estos resultados y con la finalidad de ahondar en el conocimiento de los efectos del enriquecimiento ambiental “clásico”, nos planteamos si en la vejez la exposición durante un tiempo corto a un ambiente enriquecido con objetos induciría efectos similares sobre la funcionalidad de los sistemas nervioso e inmunitario. Además, nos propusimos comprobar si esta estrategia podría revertir el deterioro conductual e inmunitario así como también aumentar la longevidad en el modelo de ratones prematuramente envejecidos (PAM) adultos. Por otra parte, con la finalidad de buscar otras nuevas estrategias de enriquecimiento ambiental diferentes a la introducción de objetos en el ambiente de estabulación de los animales y teniendo en cuenta los conocidos efectos beneficiosos sobre la salud desde tiempos muy antiguos de la terapia de baños o balneoterapia, especialmente en la vejez, nos propusimos analizar si dicha hidroterapia o tratamiento de baños podría revertir, al igual que el enriquecimiento con objetos, el deterioro conductual e inmunitario característicos del envejecimiento y alargar la longevidad media de los individuos. Si ocurriera así, se podría proponer a la hidroterapia como una nueva estrategia de enriquecimiento ambiental. En este contexto, además, conociendo las propiedades beneficiosas sobre el estado de salud de las aguas mineralo-medicinales, nos planteamos saber si un tratamiento de hidroterapia utilizando este tipo de aguas ricas en sulfuros podría de igual manera frenar el deterioro conductual e inmunitario característicos de la vejez. Por todo ello, nos propusimos como **cuarto objetivo general**:

**4. Estrategias de enriquecimiento ambiental para mejorar parámetros conductuales, así como de función y estrés oxidativo en leucocitos de ratones con envejecimiento cronológico, prematuro y acelerado.**

Dicho Objetivo se desarrolló en los siguientes objetivos parciales:

- 4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.**
- 4.2. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.**
- 4.3. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.**
- 4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.**

Además de las estrategias de enriquecimiento ambiental comentadas anteriormente, existen gran variedad de intervenciones de estilo de vida que han demostrado su capacidad para ralentizar e incluso revertir los efectos deletéreos del envejecimiento sobre el organismo, llegando incluso a alargar la vida del individuo, como pueden ser las intervenciones de tipo nutricional. No obstante, y aprovechando diversas colaboraciones con otros grupos de investigación así como con empresas (proyectos acogidos bajo el Art.83), en esta parte final de la presente Tesis nos planteamos qué otras intervenciones, de distinta naturaleza a las más comúnmente estudiadas, podrían ejercer un posible efecto beneficioso sobre los sistemas reguladores en la vejez y, por tanto, sobre el estado de salud en estas últimas etapas de la vida. Buscando, además, que dichas intervenciones tuvieran una más que

posible traslación al ser humano. Por ello, nos propusimos desarrollar como **quinto objetivo general** en el presente trabajo:

**5. Utilización de estrategias para mejorar la conducta de ratones con envejecimiento cronológico, así como la función y estrés oxidativo de sus leucocitos.**

Objetivo que, a su vez, se desdobló en los siguientes objetivos parciales:

- 5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.**
- 5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.**
- 5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.**
- 5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones viejos.**





# **Material y métodos**



### 3.1. MATERIAL

#### 3.1.1. Material biológico

##### 3.1.1.1. Animales

Para la realización de la presente Tesis, los animales de experimentación empleados fueron ratones (*Mus musculus*) y ratas (*Rattus norvegicus*). Todos los experimentos realizados con los animales a lo largo de la presente tesis se realizaron siguiendo las directrices dictadas en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre de 2005 (BOE nº252), acerca de la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como con la autorización del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (proyecto PROEX 373/15).

Los ratones utilizados fueron:

- Ratones hembras ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1, de diferentes edades y características y marcadas con ácido pícrico para permitir su seguimiento individualizado. Los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid), a una temperatura constante de  $22\pm 2$  °C y fotoperiodo invertido (12 h de luz:12 h de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 y 20:00 horas). Además, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta de mantenimiento específica para roedores (dieta 2014, Harlan) y agua corriente. Todos los detalles relacionados con las edades y características de los animales empleados y cambios de dieta se especificarán en los correspondientes sub-apartados del apartado 2.2. “DISEÑOS EXPERIMENTALES” de la presente Tesis.
- Ratones macho vírgenes de la cepa B6D2F1 (híbrido de madre C57BL/6 y padre DBA/2) (Harlan) viejos (18 meses de edad), utilizados para el estudio de los efectos del atenolol sobre la función inmunitaria. Los animales fueron mantenidos en el animalario de la Facultad de Medicina (Universidad Complutense de Madrid), a una temperatura constante de  $22\pm 2$  °C y fotoperiodo no invertido (12 h de luz:12 h de oscuridad, con cambio horario a las 8:00 y 20:00 horas). Además, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta de mantenimiento específica para roedores (dieta 2014, Harlan) y agua corriente.

Las ratas utilizadas en dos de los diseños que conforman el presente trabajo pertenecían a la cepa Wistar, de diferentes sexos y

edades y estabuladas en similares condiciones a las comentadas anteriormente, con fotoperiodo invertido. Las características y edades de los individuos se detallarán al explicar los correspondientes diseños en el apartado 3.2. “DISEÑOS EXPERIMENTALES”.

### 3.1.1.2. Líneas celulares

Con el fin de determinar la actividad citotóxica NK de los leucocitos, se emplearon como células diana la línea celular YAC-1, procedente de un linfoma murino de células T inducido por el virus de Moloney. Dicha línea fue cedida por el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Madrid y mantenida hasta su uso a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en condiciones de esterilidad y en alícuotas de  $2 \times 10^6$  células/mL de medio completo (RPMI 1640 con 1% de gentamicina, 0,1 mg/ml, y suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementarizado) y 10% de DMSO, como agente crioprotector.

### 3.1.2. Medios de cultivo y soluciones salinas

3.1.2.1. Soluciones salinas preparadas en el laboratorio con agua ultrapura

- Solución salina tamponada con fosfatos (PBS). Su composición por litro de agua ultrapura es la siguiente: cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) 123,2 mM (PANREAC); fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10,84 mM (PANREAC) y fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): 3,23 mM (PANREAC). Se ajusta el pH a 7,4, se esteriliza en autoclave durante 1 h a 1 atmósfera de presión y  $120^{\circ}\text{C}$ . Se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Solución salina balanceada de Hank. Su composición por litro de agua ultrapura es: D(+)-Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 5,55 mM (PANREAC); cloruro magnésico ( $\text{MgCl}_2$ ) 1 mM (PANREAC); cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ) 136,89 mM (PANREAC); cloruro potásico ( $\text{KCl}$ ) 5,36 mM (PANREAC); cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) 1,26 mM (PANREAC); fosfato magnésico ( $\text{MgHPO}_4$ ) 0,80 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,44 mM (PANREAC); fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,42 mM (PANREAC); bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) 4,16 mM (PANREAC). Se ajusta el pH a 7,4, se esteriliza mediante filtración a través de una membrana de  $0,22\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro (MILLIPORE). Se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Tampón fosfato 50 mM (células). Su composición por litro de agua ultra puraa es: fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM (PANREAC). El pH se ajusta a 7,4. Posteriormente se almacena a 4°C.
- Tampón fosfato 50 mM dipotásico (órgano). Su composición por litro de agua ultrapura es: fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM (PANREAC). El pH se ajusta a 7,4. Posteriormente se almacena a 4°C.
- Tampón fosfato 50 mM EDTA 6,3 mM (células). Su composición por litro de agua ultrapura es: fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); ácido etilediaminotetraacético (EDTA) 6,3 mM (SIGMA). El pH se ajusta a 7,4. Posteriormente se almacena a 4°C.
- Tampón fosfato 50 mM dipotásico EDTA 6,3 mM (órgano). Su composición por litro de agua ultrapura es: fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM (PANREAC); ácido etilediaminotetraacético (EDTA) 6,3 mM (SIGMA). El pH se ajusta a 7,4. Posteriormente se almacena a 4°C.
- Tampón fostato 100 mM EDTA 50 mM (células). Su composición por litro de agua ultrapura es: fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 100 mM (PANREAC); fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 100 mM (PANREAC); ácido etilediaminotetraacético (EDTA) 50 mM (SIGMA). El pH se ajusta a 8. Posteriormente se almacena a 4°C.

### 3.1.2.2. Medios comerciales

- RPMI 1640 con L-glutamina (20mM) y HEPES (25mM) (PAA) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (SFT) (PAA) (descomplementarizado mediante calentamiento en baño a 56 °C durante 30 min) y gentamicina al 1% v/v (0,1 mg/ml) (PAA). También llamado medio completo.
- RPMI 1640 sin L-Glutamina y con Hepes (25mM) (PAA).
- RPMI 1640 con L-Glutamina y sin rojo fenol (PAA).

Estos medios se suministran en condiciones estériles y se conservan a 2-8 °C.

### 3.1.3. Reactivos y kits comerciales

- 1,4-Dioxano (MERCK).
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido clorhídrico al 37% (HCl) (PANREAC). Se emplea a una concentración de 0,5 N.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido perclórico al 60 % (HClO<sub>4</sub>) (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido pícrico (PANREAC).
- Ácido tricloroacético 20% p/v (TCA, CCl<sub>3</sub>COOH) (PANREAC).
- Agua destilada y agua ultrapura (MILLIPORE).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH).
- Anticuerpos monoclonales anti-CD45 conjugado con PerCP; anti-CD19 conjugados con FITC; anti-CD3 conjugado con APC (BD Biosciences).
- Azul de nitrotetrazolio (NBT) (SIGMA-ALDRICH). En el momento de su utilización, se reconstituye con solución de Hank para obtener una concentración de 1 mg/ml. Se conserva a 4 °C en oscuridad.
- Azul tripan, solución al 0,4% (SIGMA-ALDRICH).
- Azur-Eosina-Azul de Metileno, solución según GIEMSA (PANREAC).
- Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>) (PANREAC).
- Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) (PANREAC).
- Cloruro magnésico (MgCl<sub>2</sub>) (PANREAC).
- Cloruro potásico (KCl) (PANREAC).
- Cloruro sódico (NaCl) (PANREAC).
- Concanavalina A (ConA) (SIGMA) a una concentración de 200 mg/mL en PBS, se alícuota a -20 °C hasta su uso. La concentración final en el pocillo es de 1 µg/ml.
- D(+)-Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (PANREAC).
- Diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Sonda fluorescente, H2DCF-DA) MOLECULAR PROBES). Se prepararon alícuotas a una concentración inicial de 10 mM en etanol al 99%, que fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.
- Dimetilsulfóxido secado (DMSO) (MERCK).
- Etanol (PANREAC).
- Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Fosfato magnésico (MgHPO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (PANREAC).
- Gentamicina (10 mg/ml) (PAA).

- Glutación oxidado (GSSG) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reducido (GSH) (SIGMA-ALDRICH).
- Glutación reductasa (GR) (SIGMA-ALDRICH).
- Hidróxido de cumeno (SIGMA-ALDRICH).
- Hidróxido potásico (KOH) (PANREAC).
- Hidróxido sódico (NaOH) (PANREAC).
- Histopaque de densidad 1,077 g/ml (SIGMA-ALDRICH). Se conserva a 2-8 °C en oscuridad.
- Kit colorimétrico para valorar actividad citotóxica (PROMEGA).
- Kit fluorométrico para valorar la actividad xantina oxidasa “Amplex Red Xantina / Xantina oxidasa” (INVITROGEN).
- Kit para valorar 6 citoquinas murina por luminometría mediante MULTIPLEX “Milliplex Map” (MILLIPORE).
- Lipopolisacárido (LPS) (SIGMA) a una concentración de 100 µg/ml de concentración en PBS, se alícuota y se conserva a -20 °C hasta su uso. La concentración final en el pocillo es de 1 µg/ml.
- Líquido de centelleo (MP).
- Metanol (PANREAC).
- N-etilmaleimida (NEM) (SIGMA-ALDRICH).
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH) (SIGMA-ALDRICH).
- O-ftalaldehído (OPT) (SIGMA-ALDRICH).
- Partículas de látex, poliestireno (SIGMA-ALDRICH), de 1,1 µm de diámetro. Se preparan al 1% en PBS. La concentración final en el ensayo es de 0,1% de partículas por ml.
- Péptido formilado (N-Formyl-Met-Leu-Phe; fMLP) de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH), reconstituido en PBS (10<sup>-2</sup> M), alicuotado y conservado a -20 °C hasta su utilización. La concentración final en el ensayo es de 10<sup>-8</sup> M.
- Suero fetal de ternera (SFT) (PAA). Se descomplementariza calentándolo en baño a 56 °C durante 30 minutos y se congela alicuotado a -20 °C hasta su utilización como componente del medio completo.
- Timidina tritiada (3H-Timidina) (MP) con una actividad específica de 35 Ci/mmol, diluida a 0,1 mCi/ml en PBS estéril y almacenada a 4 °C.



### 3.1.4. Material de laboratorio

- Agujas
- Cámaras de Boyden. Fabricadas de metacrilato, presentas dos compartimentos de 13 mm de diámetro externo, 9 mm de diámetro interno y 5 mm de altura cada uno.
- Contador de células manual (REXEL).
- Cronómetros
- Cubetas de vidrio óptico y de cuarzo de 10 mm de paso óptico (HELLMA).
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE) transparentables de 13 mm de diámetro y 3  $\mu\text{m}$  de poro, para las pruebas de quimiotaxis.
- Filtros de nitrocelulosa (MILLIPORE). De 33 mm de diámetro y 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, para la esterilización de medios.
- Flask de cultivo (NUNC).
- Gradillas.
- Guantes.
- Hemocitómetro de Neubauer (BLAU BRAND).
- Material de disección: tijeras, pinzas, etc.
- Material de vidrio: tubos, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, probetas, vasos de precipitados, termómetros, etc.
- Materiales de plástico: jeringas y jeringuillas desechables, tubos, puntas de pipetas automáticas, vasos, eppendorfs, parafilm, etc.
- Papel de filtro para recoger células (SKATRON INSTRUMENTS).
- Pipeta de repetición Multipette plus (EPPENDORF).
- Pipetas automáticas y multidispensadoras (BOECO y GILSON).
- Placas de 96 pocillos con fondo plano transparentes (NUNC), y de fondo en U transparentes (NUNC).
- Placas de 96 pocillos negras y de fondo plano (NUNC).
- Placas MIF (KARTELL) de 8 pocillos (1,5 cm de diámetro).

La esterilización de material de efectúa en autoclave a 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 1 hora. Para el material que no puede ser sometido a autoclave (pipetas automáticas, placas MIF, etc.), se emplea luz ultravioleta durante 20 minutos antes de su utilización.

### 3.1.5. Aparataje

- Agitador de tubos (BUNSEN) y de placas (LABNET).
- Agitador magnético (BOECO).

- Aparatos pruebas de conducta: campo abierto, tablero de agujeros, laberinto en T (Taller de Físicas, UCM) y laberinto en cruz elevado (PANLAB).
- Autoclave (SELECTA).
- Balanzas de precisión (METTLER TOLEDO y BOECO).
- Baño con sonicación (BRANSON 200).
- Baño termostatzado con agitación (MEMMERT).
- Bomba de filtración (MILLIPORE).
- Cabinas de flujo laminar (TELSTAR AV-100, TELSAR MICRO-H).
- Centrífugas con refrigeración para tubos de vidrio de calibre 18 y *eppendorfs* (HERAEUS, KUBOTA 2800, HETTICH ZENTRIFUGEN).
- Citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).
- Congelador de -20 °C (LIEBHERR) y de -80 °C (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC y THERMO SCIENTIFIC).
- Contador beta (PERKIN-ELMER).
- Destilador de agua y agua ultrapura (MILLIPORE).
- Dispensador de hielo picado (SCOTSMAN).
- Espectrofotómetro (THERMO SPECTRONIC).
- Espectrofotómetro y Fluorímetro de placas (BMG).
- Frigoríficos de 4 °C (FAGOR y LYNX).
- Granatario (PRECISA INSTRUMENTS).
- Incubadoras termostatzadas con atmósfera saturada de humedad y de CO<sub>2</sub> regulable (SELECTA y HERAEUS).
- Luminómetro (Luminex 200TM, LUMINEX XMAPTM TECHNOLOGY).
- Microscopio invertido (PLEUGER).
- Microscopio óptico (NIKON).
- Objetos de enriquecimiento ambiental: casa o iglú, cubo de plástico naranja, pelota, aro, bola agujereada, túnel amarillo, objeto rugoso rojo (LILLICO, PANLAB). Bola de billar y bola metálica (El Corté Inglés)
- pH-metro (XS INSTRUMENTS) con electrodo (HAMILTON).
- Recolector semiautomático de células (SKATRON INSTRUMENTS).
- Sistema de filtración por vacío (MILLIPORE).
- Sonicador (BANDELIN SONOPULS).

## 3.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES

### 3.2.1. Profundización y nuevas aproximaciones en el estudio de la inmunosenescencia en el envejecimiento cronológico en ratones.

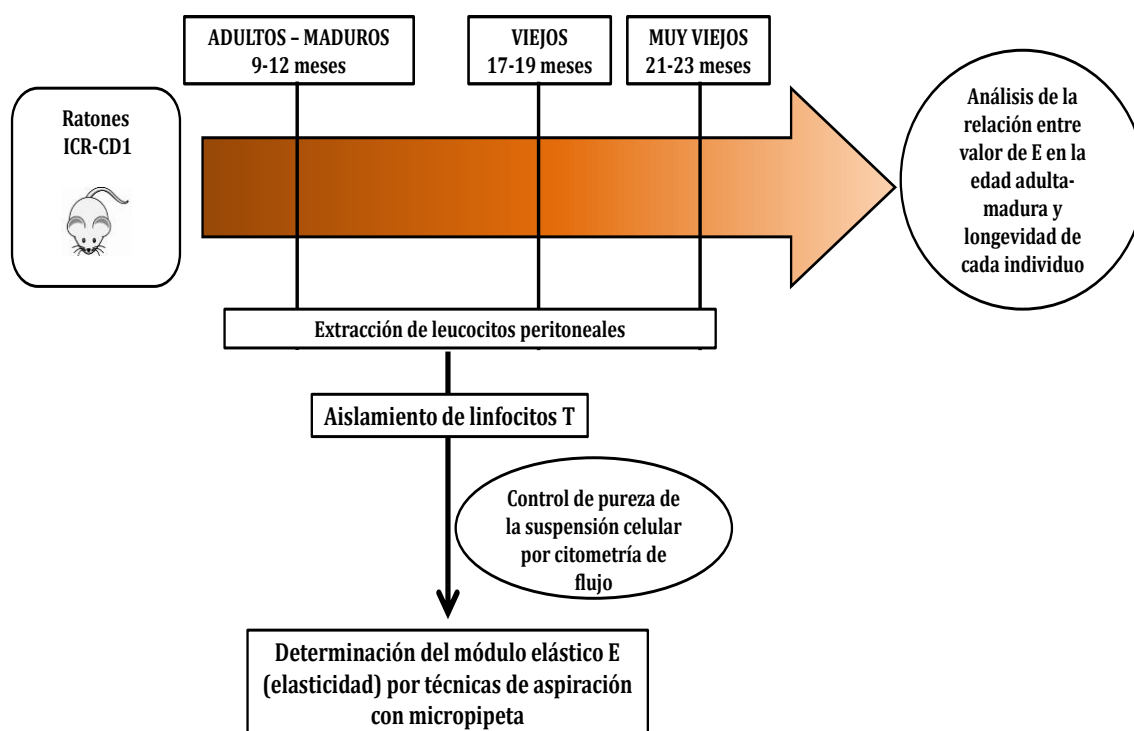
#### 3.2.1.1. *Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.*

Se utilizaron 10 ratones hembra ex-reproductoras “intermedias” de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) estabuladas en grupo y marcadas con ácido pícrico para permitir su seguimiento individual.

Para realizar este objetivo, se extrajeron los leucocitos peritoneales de todos los animales del estudio a las edades de 9-12 (adultos-maduros), 17-19 (viejos) y 21-23 meses (muy viejos) siguiendo la metodología descrita en el sub-apartado 3.3.5.3. “Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y viabilidad celular” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES de la presente Tesis.

Una vez obtenidas dichas células inmunitarias, se procedió a separar la subpoblación de linfocitos T, en base a la diferente capacidad de adhesión de los leucocitos, así como se comprobó la pureza de la suspensión de células T obtenida mediante técnicas de citometría de flujo (ambos métodos se encuentran explicados en detalle en el sub-apartado 3.3.5.4. “Obtención de linfocitos T peritoneales” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES de este trabajo). A continuación, la suspensión de linfocitos T peritoneales se sometió a técnicas de aspiración con micropipeta para obtener el valor del módulo elástico E, válido para determinar el grado de elasticidad de dichas células. La metodología respecto a esta técnica se realizó siguiendo una ya descrita previamente (Esteban-Manzanares *et al.*, 2017), en el Departamento de Ciencias de Materiales de la ETSI de Caminos, Canales y Puertos de la Universidad Politécnica de Madrid. Además, se registró el momento de la muerte natural de cada individuo del estudio para analizar la posible relación entre los valores del módulo elástico E de cada uno de ellos en la edad adulta-madura y la longevidad de los mismos.

## Material y métodos



**Figura 5.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio longitudinal del módulo elástico E (elasticidad) de los linfocitos T peritoneales. A ratones hembra ICR-CD1 se les extrajeron los leucocitos peritoneales a los 9-12 (adultos-maduros), 17-19 (viejos) y 21-23 meses (muy viejos) de edad. Posteriormente, en base a las diferencias de adhesión de las distintas subpoblaciones leucocitarias, se aislaron los linfocitos T. El grado de pureza de esta suspensión fue periódicamente comprobada mediante técnicas de citometría de flujo. A continuación se determinó el valor del módulo elástico E (elasticidad) en dichos linfocitos T mediante técnicas de aspiración con micropipeta, en cada una de las edades seleccionadas. Así mismo, se registró el momento de la muerte natural de cada individuo para estudiar la posible relación entre el valor de su módulo elástico E en la edad adulta-madura y su longevidad.

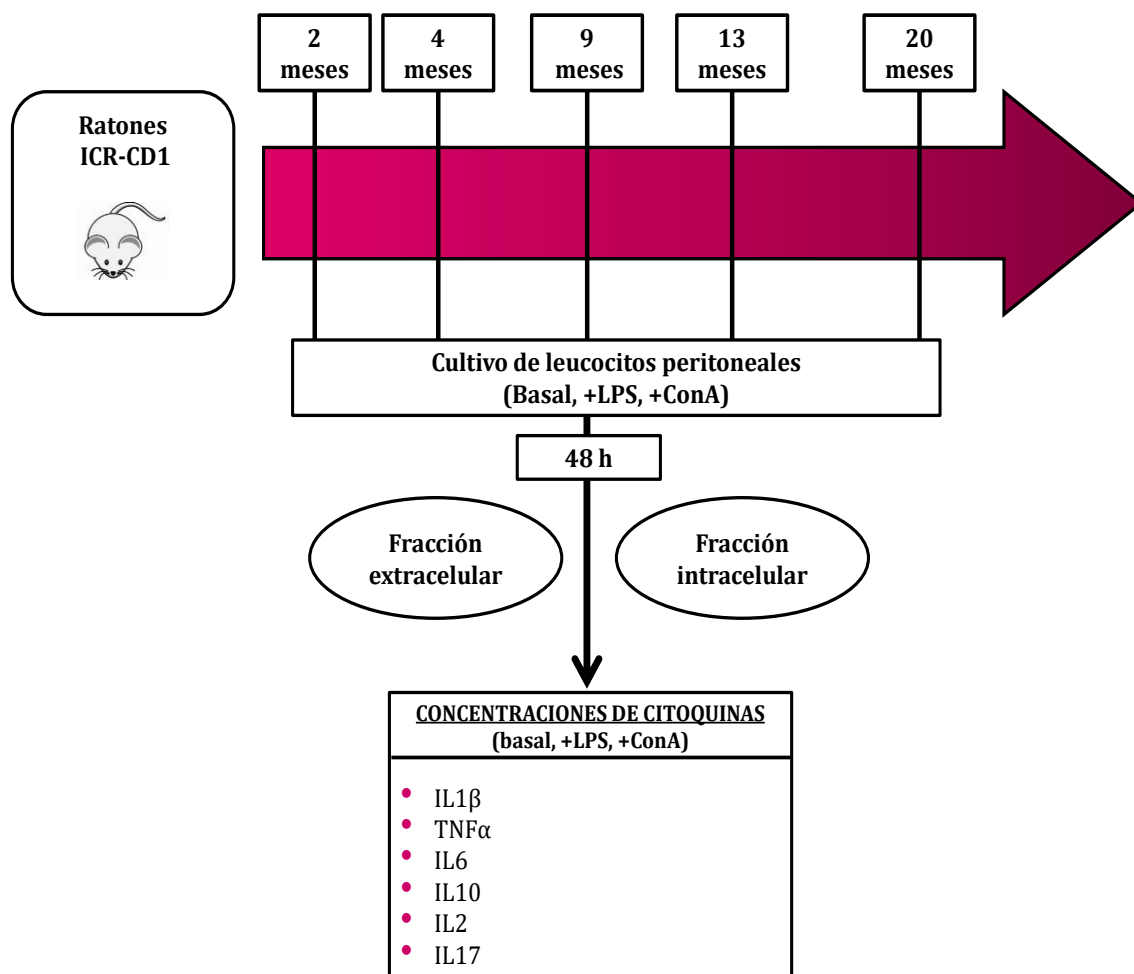
### 3.2.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.

Se utilizaron 4 ratones hembras ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.), estabuladas en grupo y marcadas con ácido pícrico para facilitar su seguimiento individual.

Para abordar este objetivo, se extrajeron los leucocitos peritoneales de todos los animales del estudio a las edades de 2 (jóvenes), 4 (adultas jóvenes), 9 (adultas), 13 (maduras) y 20 meses (viejas) y siguiendo la metodología descrita en el sub-apartado 3.3.5.3. “Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y viabilidad celular” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo.

Las células se cultivaron tanto en ausencia como en presencia de los mitógenos LPS y ConA. Transcurridas 48 h, se obtuvieron los

sobrenadantes y el contenido intracelular y ambas fracciones se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente en dichas muestras, se determinaron las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17 mediante luminometría, tanto secretados al medio de cultivo por los leucocitos peritoneales en cultivo como los contenidos en el interior de dichas células inmunitarias en estado no estimulado (basal) como estimulado por los mitógenos anteriormente mencionados.

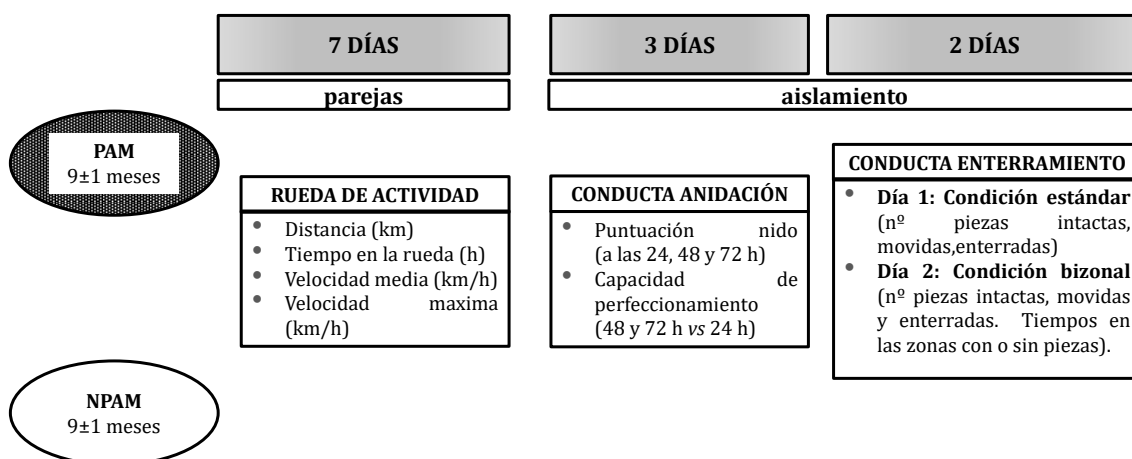


**Figura 6.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas secretadas e intracelulares en leucocitos en cultivo. A ratones hembra ICR-CD1 se les extrajeron los leucocitos peritoneales a los 2, 4, 9, 13 y 20 meses de edad (jóvenes, adultas jóvenes, adultas, maduras y viejas, respectivamente). Dichas células se cultivaron en ausencia (condición basal) o en presencia de los mitógenos LPS y ConA durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron los sobrenadantes (fracción extracelular) y el contenido celular (fracción intracelular) y se determinaron en ellos, mediante luminometría, las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

### 3.2.2. Profundización en parámetros conductuales e inmunitarios en ratones prematuramente envejecidos (PAM).

#### 3.2.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) adultas ( $9\pm 1$  meses de edad) PAM Y NPAM ( $n=8$ , en ambos casos), seleccionados según la metodología descrita en el apartado 3.3.1. “Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM)” del presente trabajo. Los animales se estabularon por parejas y se marcaron con ácido pícrico para facilitar su seguimiento individual.



**Figura 7.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio conductual de los PAM adultos. Un grupo de PAM ( $n=8$ ) y NPAM ( $n=8$ ) hembras ICR-CD1 adultas ( $9\pm 1$  meses de edad) fueron estabuladas por parejas para evaluar diversos parámetros de actividad física voluntaria mediante el uso de una rueda de actividad, insertada en la jaula, durante 7 días consecutivos. A continuación, los animales se individualizaron para estudiar sus conductas de anidación (3 días de duración) y de enterramiento, mediante la “prueba de las canicas” (2 días de duración). PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos.

Todos los ratones del estudio se enfrentaron a diversas pruebas conductuales. En primer lugar, se estudió su actividad física voluntaria. Para ello, se distribuyeron los PAM Y NPAM en 4 jaulas, a razón de 2 ratones por jaula, colocándose en cada una de ellas una rueda de actividad, que permitió evaluar diariamente diversos parámetros, como fueron la distancia total recorrida (Km), el tiempo de uso (h) y las velocidades media y máxima (Km/h) durante 7 días consecutivos. Posteriormente, los PAM y NPAM se aislaron en jaulas individuales para someterse a 2 pruebas para evaluar su conducta de ansiedad. Inicialmente, se estudió la conducta de anidación, con una duración de 3 días. A continuación, los animales se sometieron a la “prueba de las

canicas”, durante 2 días consecutivos para analizar su conducta de enterramiento.

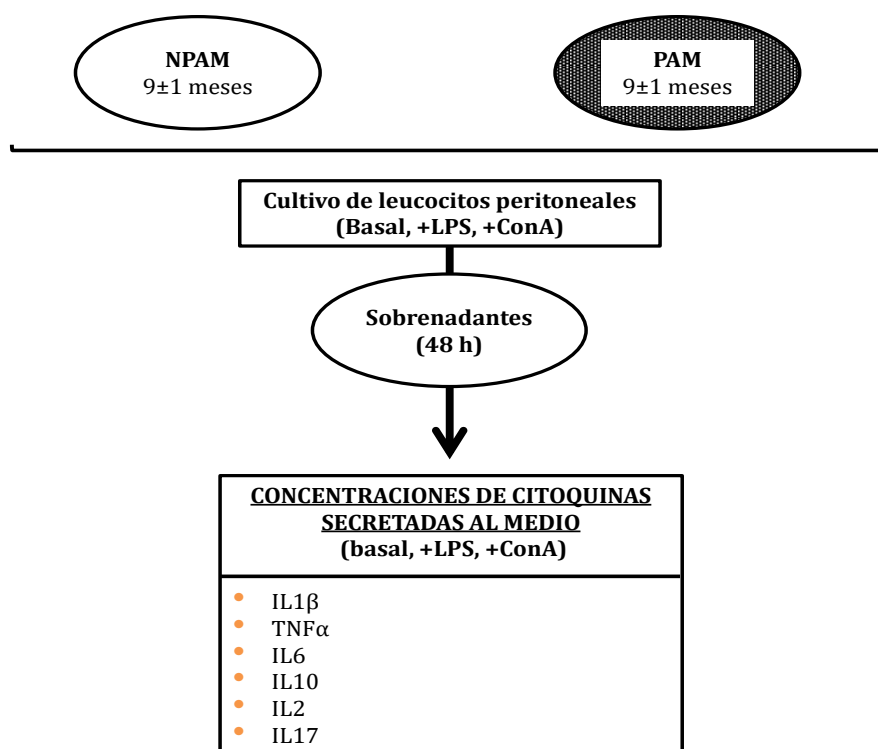
La metodología empleada para realizar este diseño experimental se explica con mayor detalle en los sub-apartados 3.3.4.4. “Determinación de la actividad física voluntaria mediante una rueda de actividad” y 3.3.4.3. “Pruebas conductuales de ansiedad”, para las conductas de anidación y de enterramiento de canicas, pertenecientes al apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES de la presente Tesis.

### *3.2.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.*

Se emplearon ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) adultas ( $9\pm 1$  meses de edad) PAM y NPAM ( $n=8$ , en ambos casos), obtenidos siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.1. “Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM)” de la presente Tesis. Los animales se estabularon en grupos, con un número máximo de 5 individuos por jaula, y se marcaron con ácido pícrico para facilitar su seguimiento individual.

Para realizar este objetivo, se extrajeron los leucocitos peritoneales de los individuos PAM y NPAM siguiendo la metodología descrita en el sub-apartado 3.3.5.3. “Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y viabilidad celular” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo. Las células se cultivaron tanto en ausencia como en presencia de los mitógenos LPS y ConA y, transcurridas 48 h, se recogieron los sobrenadantes de dichos cultivos, tanto en estado no estimulado como estimulado, que se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente y mediante técnicas de luminometría, en dichos sobrenadantes se valoraron las concentraciones de las siguientes citoquinas secretadas por las células inmunitarias al medio: IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17.

## Material y métodos



**Figura 8.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos peritoneales de PAM adultos en cultivo. Se extrajeron los leucocitos peritoneales de PAM (n=8) y NPAM (n=8) hembras ICR-CD1 adultas (9±1 meses de edad). Estas células se cultivaron en ausencia (condición basal) o en presencia de los mitógenos LPS y ConA durante 48 h. A continuación se obtuvieron los sobrenadantes y se determinaron, mediante luminometría, las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

### 3.2.3. Estudio de los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en modelos murinos a diferentes edades.

#### 3.2.3.1. Efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.

Se utilizaron ratas machos y hembras de la cepa WISTAR (Harlan) clasificadas al azar en cuatro grupos experimentales de estudio. 8 ratas macho y 8 ratas hembra fueron sometidos a un protocolo de separación materna (SM) consistente en separar a las crías de la madre durante 3 horas diarias desde los 2 hasta los 21 días de edad, esto es, durante el periodo de lactancia (grupos SM). Paralelamente, 8 machos y 8 hembras se mantuvieron junto a la madre durante todo este periodo de tiempo, actuando como grupos control (grupos C). Posteriormente, todos los animales del estudio fueron mantenidos en condiciones estándar de estabulación hasta alcanzar la



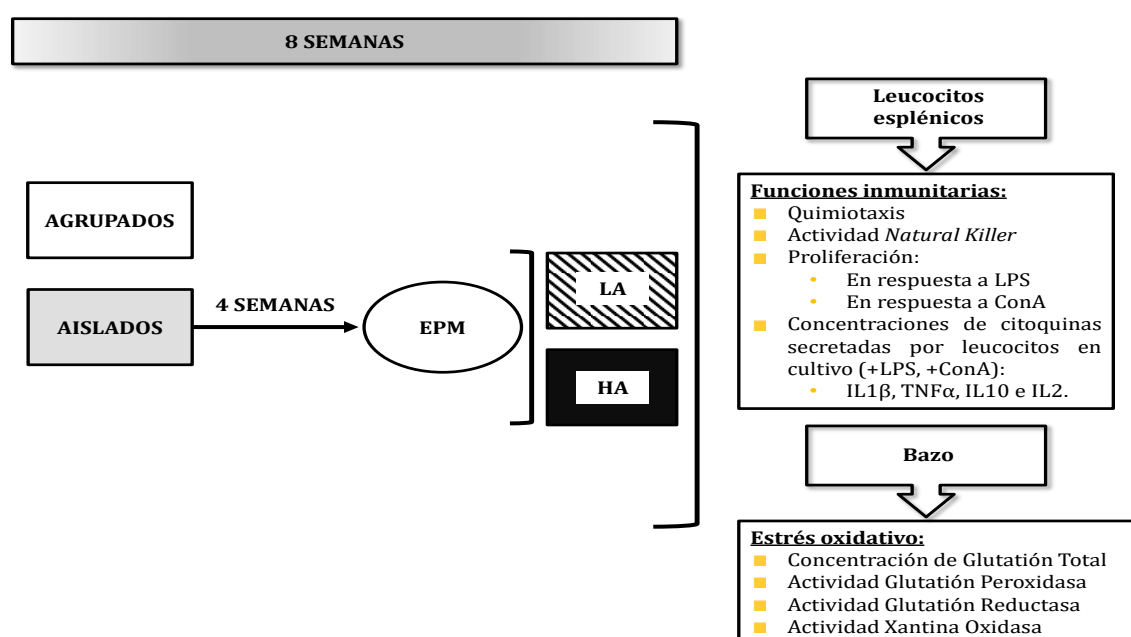
Tanto el protocolo de separación materna como el mantenimiento de los animales hasta la edad adulta tuvieron lugar en el laboratorio de la Dra. María Javier Ramírez, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra.

```
graph LR
    subgraph DPN2 [DPN2]
        subgraph LACTANCIA [LACTANCIA]
            GC[GRUPOS CONTROL]
            MC[Mantenidos con la madre]
        end
        subgraph SEPARACION [GRUPOS SEPARACIÓN MATERNA]
            SM[Separados de la madre 3 h/día]
        end
    end
    LACTANCIA -.-> DPN60_75
    SEPARACION -.-> DPN60_75
    subgraph DPN60_75 [DPN60-75]
        subgraph EDAD_ADULTA [EDAD ADULTA]
            LE[Leucocitos esplénicos]
            LT[Leucocitos tímicos]
            FIF[Funciones inmunitarias:  
- Quimiotaxis  
- Actividad Natural Killer  
- Proliferación:  
    - En respuesta a LPS  
    - En respuesta a ConA]
        end
    end
```

**Figura 9.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas Wistar adultas machos y hembras. Ratas machos y hembras de 2 días de edad (n=8, respectivamente), se sometieron a un protocolo de separación materna consistente separar a las crías de la madre durante 3 horas diarias hasta los 21 días de edad (período de lactancia). Paralelamente, dos grupos de ratas machos y hembras de la misma edad (n=8, respectivamente) se mantuvieron siempre junto a su madre, siendo los grupos control. Al alcanzar la edad adulta (60-75 días de edad), se obtuvieron los bazo y timos de todos los animales del estudio para seguidamente extraer los leucocitos esplénicos y tímicos, donde se evaluaron la quimiotaxis, la actividad citotóxica NK y la proliferación (en respuesta a los mitógenos LPS y ConA) como parámetros de función inmunitaria. DPN: día post-natal, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

### 3.2.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre la función inmunitaria y el estrés oxidativo en ratas macho.

El desarrollo del modelo experimental de aislamiento social se llevó a cabo por el grupo de investigación del Dr. César Venero, en el Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad de educación a Distancia (UNED) de Madrid. Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar (Harlan), mantenidas en condiciones estándar y por pares hasta su vejez (20 meses de edad). A partir de este momento, un grupo de animales seleccionadas al azar fueron mantenidos en pareja (grupo AGRUPADOS, n=8) o aislados durante 8 semanas (grupo AISLADOS, n=9).



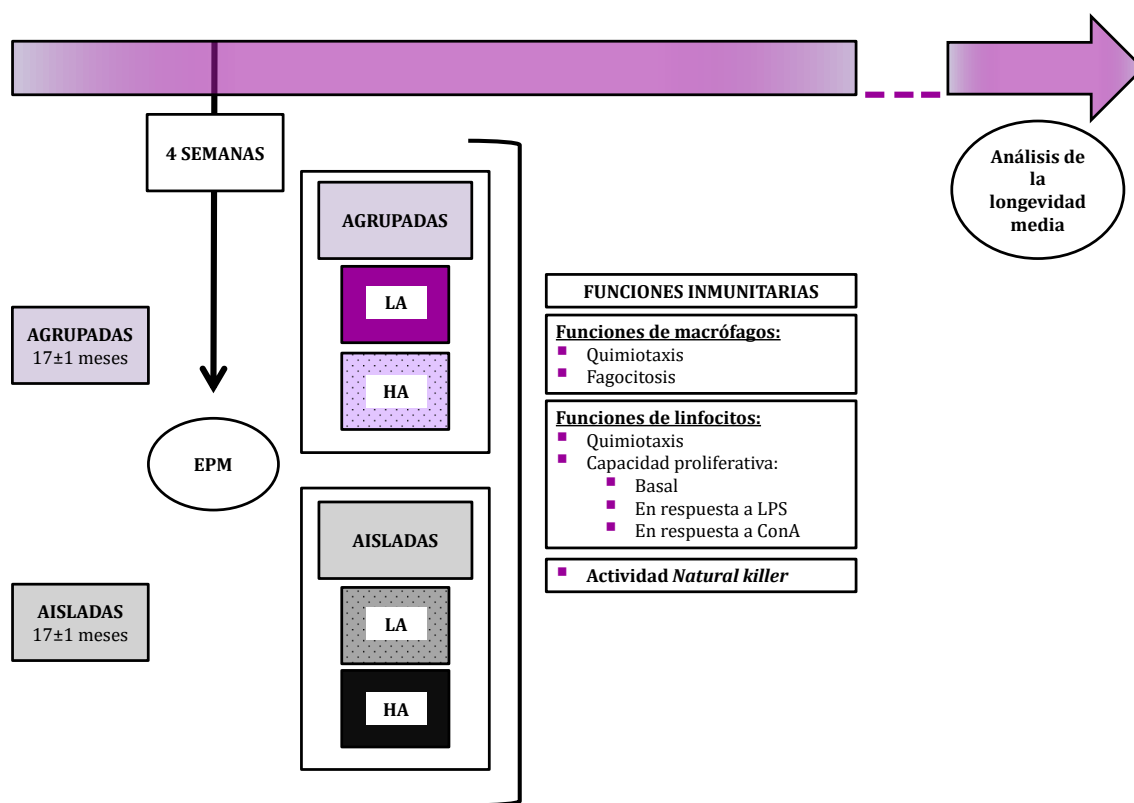
**Figura 10.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo en ratas Wistar viejas (20±1 meses de edad) macho. Tras 4 semanas de aislamiento social, las ratas aisladas (grupo AISLADOS, n=9) se sometieron al laberinto en cruz elevado y fueron clasificadas en individuos con baja ansiedad (LA, n=5) o con alta ansiedad (HA, n=4). Seguidamente, tanto los animales aislados como los mantenidos en pareja (grupo AGRUPADOS, n=8) se sacrificaron y se valoraron en los leucocitos esplénicos parámetros de función inmunitaria (quimiotaxis, actividad citotóxica NK y respuesta de proliferación a los mitógenos LPS y ConA). Así mismo, en los sobrenadantes de los cultivos de leucocitos, se determinaron las concentraciones de las citoquinas IL1β, TNFα, IL10 e IL2 secretadas por estas células. Además, en el bazo se determinaron la concentración de glutatión total y las actividades enzimáticas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa, como parámetros de estrés oxidativo. EPM: *Elevated Plus Maze* o laberinto en cruz elevado, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumoral Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

El protocolo de aislamiento seguido se explica en detalle en el sub-apartado 3.3.2. “Protocolo de aislamiento social”, perteneciente al apartado de MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo. Transcurridas 4 semanas, los animales aislados se sometieron a la prueba conductual “laberinto en cruz elevado”, con el fin de valorar sus niveles de ansiedad tras el aislamiento. Así, teniendo en cuenta el tiempo que cada animal permanecía en los brazos abiertos del aparato (expresado en porcentaje, con respecto al tiempo total de la prueba), las ratas aisladas se clasificaron en animales con bajos niveles de ansiedad (LA, del inglés *low anxiety*, n=5), con valores por encima de la media del grupo AISLADOS, o con altos niveles de ansiedad (HA, del inglés *high anxiety*, n=5), con valores por debajo del valor medio.

Transcurridas 8 semanas desde el inicio del protocolo de aislamiento, todos los animales fueron sacrificados (inyección de una alta dosis del anestésico tribromoetanol, 200 mg/kg) y se recibieron los bazo en nuestro laboratorio de investigación. Un fragmento de este órgano se trabajó en fresco para la obtención de los leucocitos. En éstos se valoraron parámetros de función inmunitaria, como fueron la capacidad quimiotáctica, la actividad citotóxica NK y la respuesta proliferativa en respuesta a los mitógenos LPS y ConA. Así mismo, en los sobrenadantes de dichos cultivos, se analizaron las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL10 e IL2 secretadas por los leucocitos. Otro fragmento de bazo, se almacenó a -80°C hasta su uso para valorar los siguientes parámetros de estrés oxidativo: la concentración de glutatión total y las actividades de la enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa.

### *3.2.3.3. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos.*

Se emplearon ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) estabuladas en condiciones estándar y en grupo, con un número máximo de 5 individuos por jaula, hasta la vejez (17 $\pm$ 1 meses de edad). Inicialmente, se establecieron dos grupos experimentales: un grupo de animales (n=10) se sometieron al protocolo de aislamiento social especificado en el apartado 3.3.2. “Protocolo de aislamiento social” de la presente Tesis (grupo AISLADAS). Paralelamente, otro grupo de ratones (n=8) se mantuvieron estabulados en grupo, a razón de 4 animales por jaula, actuando como grupo control (grupo AGRUPADAS). Transcurridas 4 semanas en estas condiciones, todos los animales del estudio se sometieron a la prueba conductual “laberinto en cruz elevado” que



**Figura 11.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio del efecto del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos. Ratones hembra ICR-CD1 viejas (17±1 meses de edad), se seleccionaron al azar para vivir aisladas (n=10) o mantenidas en grupo (n=8). Tras 4 semanas de aislamiento social, todos los animales se sometieron al “laberinto en cruz elevado” y se clasificaron en animales LA, con menores niveles de ansiedad (AGRUPADAS LA n=4, AISLADAS LA n=5), y en animales HA, con mayores niveles de ansiedad (AGRUPADAS HA n=4, AISLADAS HA n=5). A continuación, se valoraron en los leucocitos peritoneales las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la proliferación basal así como en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK. Finalmente, los animales se mantuvieron de por vida aislados o en grupo para analizar los efectos del aislamiento y de la ansiedad sobre la longevidad media. EPM=*Elevated Plus Maze* o laberinto en cruz elevado, LA=*Low Anxiety* o baja ansiedad, HA=*High Anxiety* o alta ansiedad, NK=*Natural killer*, LPS=Lipopolisacárido, ConA=Concanavalina A, IL=Interleuquina, TNF=*Tumoral Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

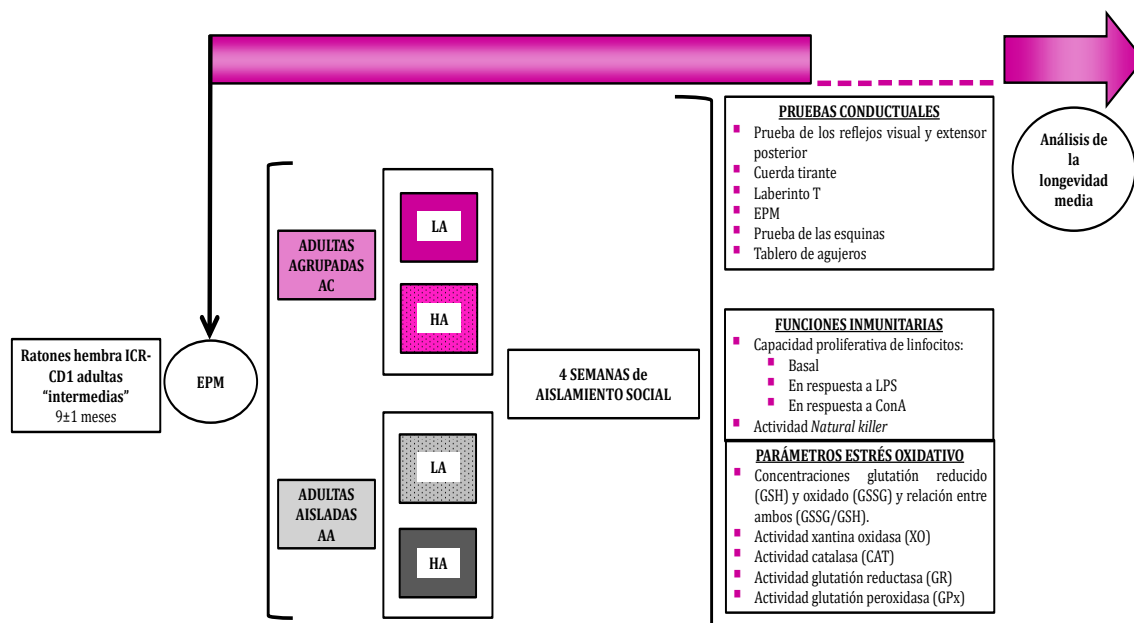
permitió determinar sus niveles de ansiedad en función del tiempo permanecido en los brazos abiertos del aparato (expresado en % de tiempo con respecto al total de la prueba). En base a este criterio, se dividieron ambos grupos experimentales en ratones con bajos niveles de ansiedad (LA, del inglés *low anxiety*), con un tiempo en los brazos abiertos mayor que la media de su correspondiente grupo (AGRUPADAS LA n=4; AISLADAS LA n=5), y ratones con altos niveles de ansiedad (HA, del inglés *high anxiety*), con un tiempo menor a la media de grupo (AGRUPADAS HA n=4; AISLADAS HA n=4). Una vez realizada esta clasificación, durante 2 semanas se llevó a cabo la extracción de los leucocitos peritoneales en los que se valoraron

diversas funciones: la capacidad quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la respuesta proliferativa tanto en estado de reposo o basal como en presencia de los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK.

Una vez realizados las valoraciones inmunitarias, todos los animales del estudio se mantuvieron estabulados en las mismas condiciones a lo largo de su vida, registrándose el momento en el que fallecieron por muerte natural con el fin de analizar los efectos del protocolo de aislamiento y de los niveles de ansiedad sobre la longevidad media.

### *3.2.3.4. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad.*

Para abordar este subobjetivo se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) adultas “intermedias” de  $9\pm 1$  meses de edad. Éstas se estabularon en grupo, con un número máximo de 5 animales por jaula hasta el momento de someterse a la prueba conductual “laberinto en cruz elevado”, que permitió evaluar sus niveles de ansiedad en función del tiempo que cada individuo permaneció en los brazos abiertos del aparato (expresado como el % de tiempo permanecido en esta zona con respecto al total de duración de la prueba). En base a este criterio, se determinaron qué animales se consideraban con bajos niveles de ansiedad (LA, del inglés *Low Anxiety*), que permanecieron más tiempo en los brazos abiertos del laberinto en relación al valor medio de todos los individuos, y qué animales eran más ansiosos (HA, del inglés *High Anxiety*), con valores por debajo de la media para dicho criterio. Una vez clasificados a los ratones según dicho criterio, se distribuyeron al azar para mantenerse estabulados en grupos (grupo AC,  $n=8$ ), actuando como controles, o para someterse al protocolo de aislamiento social especificado en el apartado 3.3.3. “Protocolo de aislamiento social” de la presente Tesis (grupo AA,  $n=9$ ). La distribución de los grupos experimentales quedó de esta manera: AC LA  $n=4$ , AC HA  $n=4$ , AA LA  $n=4$  y AA HA  $n=5$ . Transcurridas 4 semanas en las condiciones de estabulación correspondientes, todos los individuos del estudio se sometieron a un estudio conductual, que se llevó a cabo durante 3 días consecutivos. El primer día, los animales realizaron la “prueba de los reflejos visual y extensor posterior” y la “cuerda tirante”, para analizar sus capacidades sensoriomotoras, así como el “laberinto T”, usada para determinar sus capacidades exploratorias y las respuestas de ansiedad. El segundo día



**Figura 12.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio del efecto del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta, la función inmunitaria y el estrés oxidativo de los leucocitos y sobre la longevidad en ratones adultos. Ratones hembra ICR-CD1 adultas “intermedias” (9±1 meses de edad), se sometieron al “laberinto en cruz elevado” (EPM) y se clasificaron como animales LA, con menores niveles de ansiedad, o HA, con mayores niveles de ansiedad. Seguidamente se distribuyeron al azar para vivir agrupadas (grupo AC, n=8. AC LA n=4, AC HA n=4) o aisladas (grupo AA, n=9. AA LA n=4, AA HA n=5). Tras 4 semanas de aislamiento social, todos los animales se sometieron a una serie de pruebas conductuales para evaluar sus capacidades sensoriomotoras (“prueba de los reflejos visual y extensor posterior” y “cuerda tirante”), sus niveles de ansiedad (“laberinto en cruz elevado” o EPM) y su comportamiento exploratorio y otras respuestas de ansiedad (“laberinto T”, “prueba de las esquinas” y “tablero de agujeros”). A continuación, se valoraron en los leucocitos peritoneales las capacidad proliferativa tanto basal como en presencia de los mitógenos LPS y ConA y la actividad citotóxica NK. Así mismo, en estas células también se determinaron las concentraciones de glutatión reducido y oxidado y la relación entre ambas formas y las actividades enzimáticas xantina oxidasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa, como parámetros de estrés oxidativo. Finalmente, los animales se mantuvieron de por vida aislados o en grupo para analizar los efectos del aislamiento y de la ansiedad sobre la longevidad media. EPM: *Elevated Plus Maze* o “laberinto en cruz elevado”, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, NK: *Natural killer*.

se sometieron al “laberinto en cruz elevado”, prueba validada para estudiar los niveles de ansiedad del individuo. Finalmente, el tercer día, los ratones realizaron la “prueba de las esquinas” y el “tablero de agujeros”, pruebas conductuales que, como el “laberinto T”, permiten evaluar la capacidad de exploración y la respuesta de ansiedad de los animales. A continuación del estudio conductual, se realizó la extracción de los leucocitos peritoneales donde se determinaron algunos parámetros de función inmunitaria como fueron la capacidad de proliferación, tanto en ausencia de estímulo o basal como en presencia de los mitógenos LPS y ConA, y la actividad citotóxica NK. Así

mismo, también en los leucocitos peritoneales se analizaron parámetros de estrés oxidativo como fueron las concentraciones de las formas reducida y oxidada del glutatión (GSH y GSSG, respectivamente) así como la relación entre ambas (GSSG/GSH) y las actividades de las enzimas xantina oxidasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa.

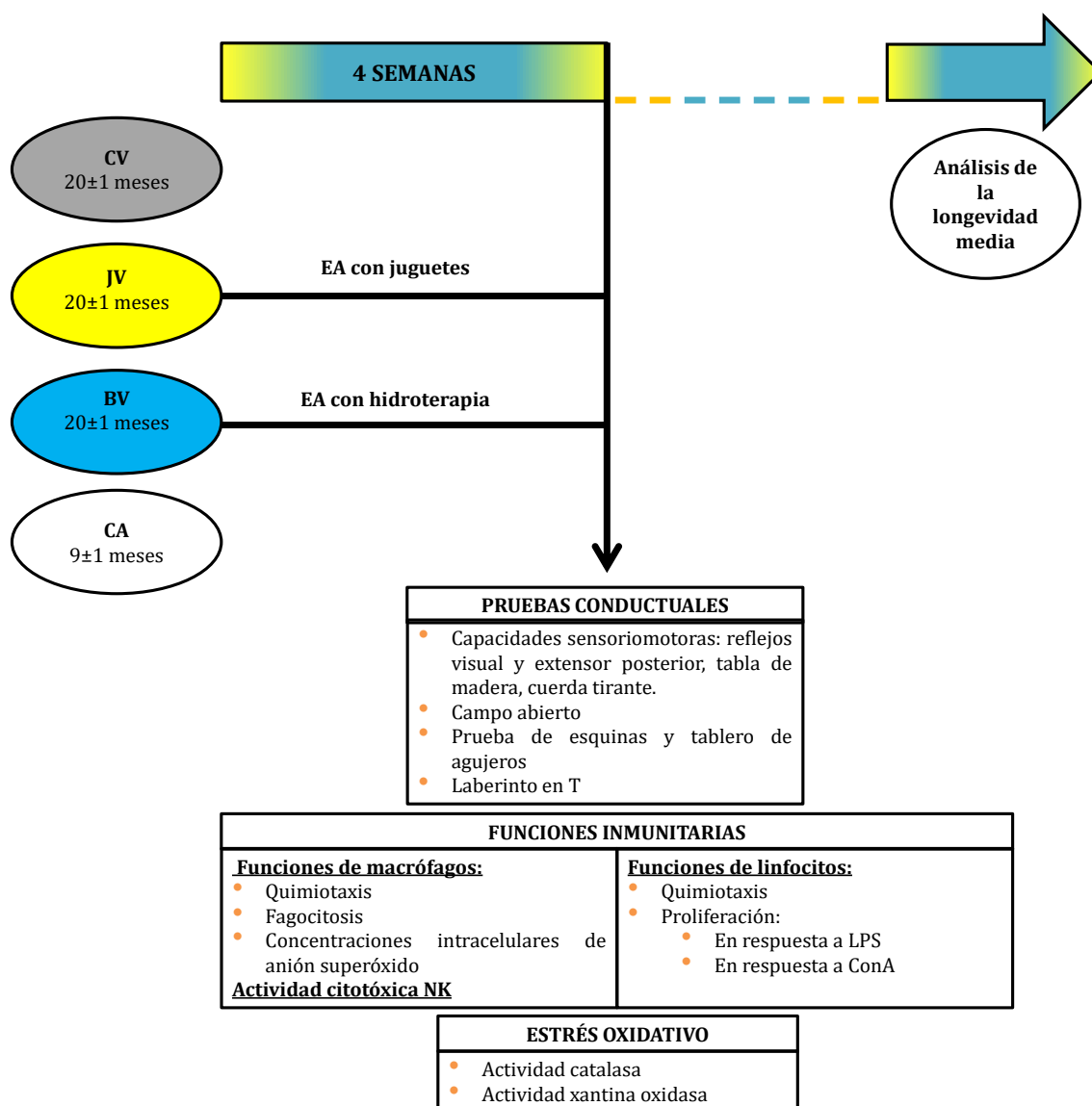
Una vez realizados el estudio conductual y las valoraciones de función inmunitaria y de estrés oxidativo, los animales se mantuvieron estabulados en las mismas condiciones a lo largo de toda su vida, registrándose el momento de su muerte por causas naturales para el estudio del efecto del aislamiento social y de los niveles de ansiedad sobre la longevidad media.

### **3.2.4. Estrategias de enriquecimiento ambiental para mejorar parámetros conductuales así como de función y estrés oxidativo en leucocitos de ratones con envejecimiento cronológico, prematuro y acelerado.**

*3.2.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.*

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) viejas ( $20 \pm 1$  meses de edad) y adultas “intermedias” ( $9 \pm 1$  meses de edad). Los animales se estabularon en grupos, con un número máximo de 6 individuos por jaula, y se marcaron con ácido pícrico para su identificación y seguimiento individualizado. Un grupo de ratones viejos ( $n=9$ ) fue sometido a un enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV). Otro grupo de ratones viejos ( $n=9$ ) se sometió a un enriquecimiento ambiental con hidroterapia (grupo BV). Las características de ambos protocolos de enriquecimiento ambiental se detallan en el sub-apartado 3.3.3. “Protocolos de enriquecimiento ambiental” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo. Adicionalmente, un grupo de ratones viejos ( $n=5$ ) y un grupo de ratones adultos ( $n=6$ ) se mantuvieron estabulados en condiciones estándar, actuando como grupos control (grupo CV y grupo CA, respectivamente).

## Material y métodos



**Figura 13.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, la función y el estrés oxidativo de leucocitos y la longevidad en ratones cronológicamente viejos. Tras 4 semanas, los ratones hembra ICR-CD1 viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un ambiente enriquecido con juguetes (grupo JV, n=9) o a hidroterapia (grupo BV, n=9), junto con los controles de igual edad cronológica (grupo CV, n=5) y adultos “intermedios” (9±1 meses de edad, grupo CA, n=6) se sometieron a una batería de pruebas de conducta para evaluar sus capacidades sensoriomotoras y sus conductas de exploración y de ansiedad. Seguidamente, se obtuvieron los leucocitos peritoneales donde se valoraron parámetros de función inmunitaria (capacidades quimiotáctica y fagocítica y concentraciones intracelulares de anión superóxido de los macrófagos, quimiotaxis y proliferación en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y actividad citotóxica NK) y de estrés oxidativo (actividades de las enzimas catalasa y xantina oxidasa). Posteriormente, el grupo de animales JV vivieron a lo largo de su vida en un ambiente enriquecido, mientras que los animales BV volvieron a estabularse en condiciones estándar similares a las del grupo CV. Se registraron los fallecimientos por muerte natural para analizar los efectos de ambas estrategias sobre la longevidad media. CV: animales control viejos, JV: ratones enriquecidos con juguetes viejos, BV: ratones sometidos a hidroterapia viejos, CA: animales control adultos, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.



Transcurridas 4 semanas de ambos tipos enriquecimiento, todos los ratones del estudio se sometieron a una batería de pruebas conductuales, durante 4 días consecutivos y siguiendo la secuencia descrita a continuación. El primer día, se realizaron las pruebas para valorar las capacidades sensoriomotoras: prueba de los reflejos visual y extensor posterior, “tabla de madera” y “cuerda tirante”. Los segundo, tercer, cuarto y quinto días, los ratones se sometieron a una serie de pruebas para evaluar su capacidad de exploración y las respuestas de ansiedad, como fueron el “campo abierto” (día 2), la “prueba de esquinas” y el “tablero de agujeros” (días 3 y 4) y el “laberinto T” (día 5). A continuación, se obtuvieron los leucocitos peritoneales, en los que se valoraron parámetros inmunitarios, tales como las capacidades quimiotáctica y fagocítica y las concentraciones intracelulares de anión superóxido de los macrófagos, la capacidad quimiotáctica y la proliferación en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK. Así mismo, también se determinaron la actividad de las enzimas catalasa y xantina oxidasa como parámetros de estrés oxidativo. Tanto las pruebas conductuales como las valoraciones inmunitarias y de estrés oxidativo tuvieron una duración de 2 semanas.

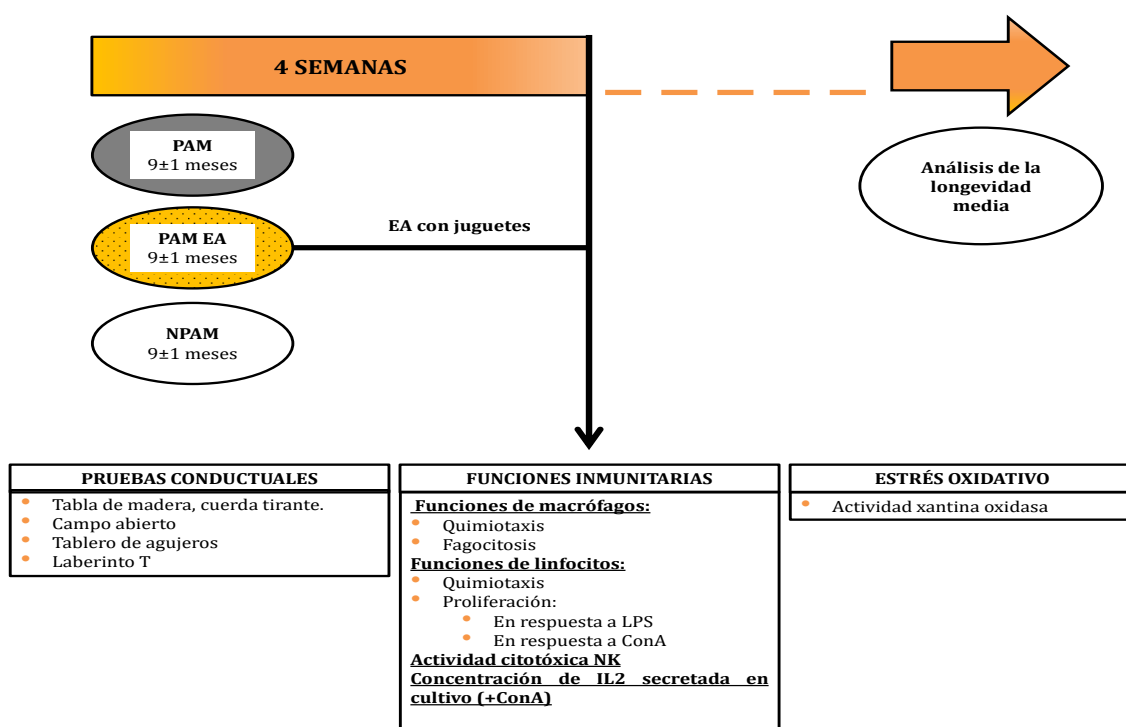
Una vez realizadas éstas, el enriquecimiento con juguetes en los ratones JV se mantuvo a lo largo de su vida mientras que la hidroterapia se interrumpió para los ratones BV y, al igual que los animales viejos control (grupo CV), se mantuvieron estabulados en condiciones estándar hasta su muerte natural. Adicionalmente, se registró el momento del fallecimiento de cada animal para analizar los efectos de ambos tipos de enriquecimiento ambiental sobre la longevidad media.

*3.2.4.2. Efecto del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.*

Se emplearon ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) adultas ( $9\pm 1$  meses de edad) PAM Y NPAM, obtenidos según la metodología descrita en el apartado 3.3.1.

“Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM)” del presente trabajo. Los animales se estabularon en grupos, con un número máximo de 7 individuos por jaula, y se marcaron con ácido pícrico para su identificación y seguimiento individualizados.

Se establecieron 3 grupos experimentales: a un grupo de PAM (grupo PAM EA,  $n=7$ ) se les practicó el protocolo de enriquecimiento ambiental con juguetes especificado en el sub-apartado 3.3.3. “Protocolos de enriquecimiento ambiental” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo. Un grupo de PAM ( $n=6$ ) y otro de NPAM ( $n=9$ ) se mantuvieron estabulados en condiciones estándar, actuando como controles del experimento.



**Figura 14.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta, la función y el estrés oxidativo de leucocitos y la longevidad en PAM adultas. Se utilizaron ratones hembra ICR-CD1 adultas PAM y NPAM (9±1 meses de edad). Un grupo de PAM se sometió a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA,  $n=7$ ) mientras que otro grupo de PAM y un grupo de NPAM se mantuvieron estabulados en condiciones estándar ( $n=6$  y  $n=9$ , respectivamente). Posteriormente, todos los animales realizaron las siguientes pruebas de conducta: la “tabla de madera” y la “cuerda tirante”, para evaluar sus capacidades sensoriomotoras, y el “tablero de agujeros” y el “laberinto T”, para analizar su capacidad de exploración y conductas de ansiedad. A continuación, en los leucocitos peritoneales se valoraron las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la proliferación en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos, la actividad citotóxica NK y la concentración de la citoquina IL2 secretada por los leucocitos cultivados en presencia de ConA, como parámetros de función inmunitaria. Así mismo, se determinó la actividad de la enzima xantina oxidasa como parámetro de estrés oxidativo. Finalmente, los animales se mantuvieron estabulados en las mismas condiciones a lo largo de su vida para analizar los efectos de esta intervención sobre la longevidad media. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina.

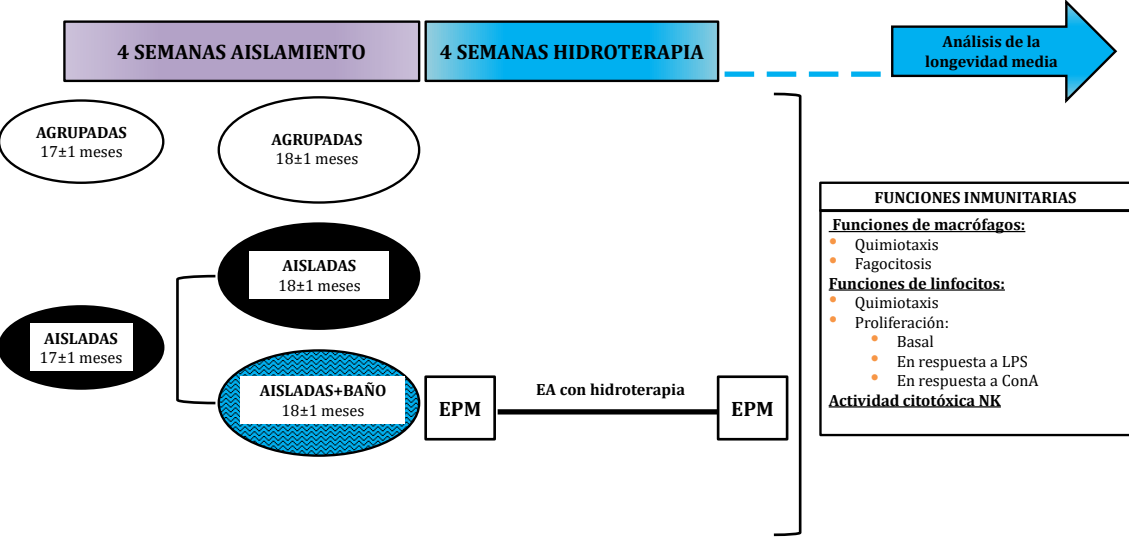
Tras 4 semanas de enriquecimiento ambiental, todos los ratones del estudio se sometieron a una batería de pruebas conductuales durante 4 días consecutivos. El primer día se llevaron a cabo la “tabla de madera” y la “cuerda tirante”, para evaluar las capacidades sensoriomotoras. El segundo día, el “campo abierto” y el tercer día, el “tablero de agujeros” y el “laberinto T”. Estas 3 últimas pruebas se seleccionaron para valorar la exploración y las conductas de ansiedad de los animales. Seguidamente, se obtuvieron los leucocitos peritoneales en los que se valoraron algunas funciones inmunitarias, como son las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la proliferación en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK.

Así mismo, también se evaluó la actividad de la enzima xantina oxidasa, como parámetro de estrés oxidativo. Además, en el sobrenadante de los cultivos de leucocitos, se determinó la concentración de la citoquina IL2 secretada al medio por dichas células en presencia del mitógeno ConA. Los estudios conductuales e inmunitarios tuvieron lugar a lo largo de 2 semanas.

Pasado este tiempo, todos los animales del estudio se mantuvieron estabulados en las mismas condiciones a lo largo de toda su vida, registrándose el momento de su fallecimiento por causas naturales para el estudio del efecto de la estrategia sobre la longevidad media de los PAM.

### *3.2.4.3. Efecto del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.*

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) viejas ( $17 \pm 1$  meses de edad), marcadas con ácido pícrico para facilitar su seguimiento individual. Inicialmente, se establecieron dos grupos experimentales: un grupo de animales se sometieron al protocolo de aislamiento social detallado en el subapartado 3.3.2. “Protocolo de aislamiento social” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES de la presente Tesis (grupo AISLADAS, N=10). Paralelamente, un grupo de ratones permanecieron estabuladas en grupo, a razón de un máximo de 4 animales por jaula, constituyendo el grupo control (grupo AGRUPADAS, n=8). Tras 4 semanas de aislamiento, se seleccionó al azar un grupo de ratones aislados para ser sometidos a un enriquecimiento ambiental con hidroterapia (grupo AISLADAS+BAÑO, n=5), cuyas características se



**Figura 15.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad, la función y el estrés oxidativo de leucocitos y la longevidad en ratones viejos aislados. Se utilizaron ratones hembra ICR-CD1 viejas ( $18 \pm 1$  meses de edad). Un grupo de animales aislados (4 semanas de aislamiento) recibió un tratamiento de hidroterapia grupal de 4 semanas de duración (grupo AISLADAS+BAÑO,  $n=5$ ). Paralelamente, un grupo de ratones viejos aislados (AISLADAS,  $n=5$ ) o conviviendo en grupo (AGRUPADAS,  $n=8$ ) se establecieron en condiciones estándar. Antes y después de la hidroterapia, los animales aislados se sometieron a la prueba conductual “laberinto en cruz elevado” para analizar los efectos de la estrategia sobre los niveles de ansiedad. Seguidamente, se extrajeron los leucocitos peritoneales de todos los individuos del estudio, donde se valoraron una serie de parámetros de función inmunitaria tales como la quimiotaxis y la fagocitosis de los macrófagos, la capacidad quimiotáctica y la proliferación (basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA) de los linfocitos y la actividad citotóxica NK. Finalmente, los animales se mantuvieron estabulados en condiciones estándar, bien aislados bien agrupados, hasta su muerte natural para analizar los efectos de la hidroterapia sobre la longevidad media. EPM: *Elevated Plus Maze* o laberinto en cruz elevado, EA: enriquecimiento ambiental, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

detallan en el apartado 3.3.3 “Protocolos de enriquecimiento ambiental” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo. Previo a esta estrategia, este grupo de ratones se enfrentó a la prueba conductual “laberinto en cruz elevado” para determinar sus niveles de ansiedad, en función del tiempo transcurrido en los brazos abiertos del aparato (expresado en % con respecto al tiempo total de la prueba). Una vez realizada dicha prueba, comenzó la estrategia de hidroterapia y, tras 4 semanas, se determinaron los niveles de ansiedad de los ratones pertenecientes al grupo AISLADAS+BAÑO, sometiéndolos nuevamente al “laberinto en cruz elevado” y teniendo en cuenta el criterio anteriormente mencionado (% de tiempo en los brazos abiertos con respecto al tiempo total de la prueba). Seguidamente, se extrajeron los leucocitos peritoneales de todos los animales del estudio (AGRUPADAS, AISLADAS y AISLADAS+BAÑO) en

los que se valoraron los siguientes parámetros funcionales: las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la proliferación basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK.

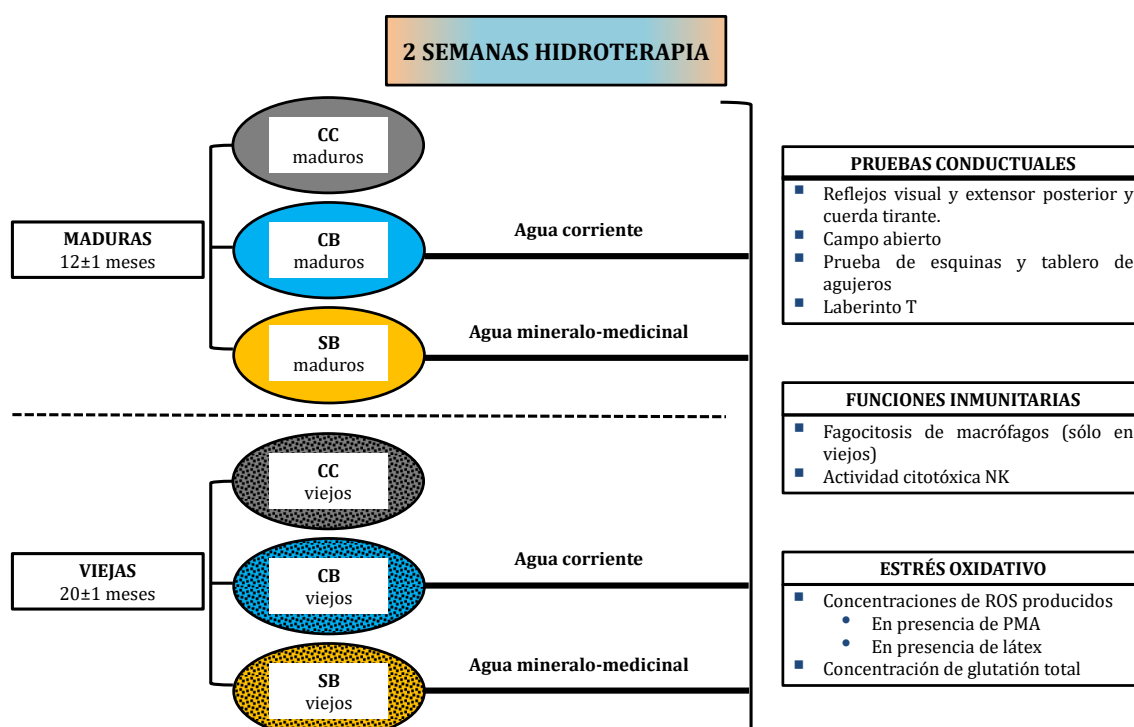
Finalizados los estudios inmunitarios, los ratones se mantuvieron estabulados en similares condiciones (agrupados o aislados) a lo largo de toda su vida, registrándose el momento de la muerte natural de cada uno de ellos para analizar el efecto que la intervención puntual de hidroterapia pudiera tener sobre la longevidad de los ratones viejos aislados.

#### *3.2.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.*

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Harlan) maduras ( $12\pm 1$  meses de edad) y viejas ( $20\pm 1$  meses de edad), mantenidas en grupos de un máximo de 6 individuos por jaula y marcadas con ácido pícrico para poder realizar su seguimiento de forma individualizada. Los experimentos realizados tanto con los ratones maduros como con los viejos, se llevaron a cabo de forma independiente, si bien ambos siguieron el mismo diseño experimental, que se detalla a continuación.

Los animales se dividieron al azar en tres grupos experimentales: un grupo de ratones se sometió a un tratamiento de hidroterapia, detallado en el sub-apartado 3.3.3. “Protocolos de enriquecimiento ambiental” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo, utilizando un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (13 mg/L), procedente del manantial “Sondeo Platea”, Calatayud, Zaragoza (D.U.P. (17/8/2006) (BOA 8/9/2006)) (grupo SB, maduros con  $n=10$  o viejos con  $n=10$ ). Paralelamente, otro grupo de ratones también recibieron el mismo tratamiento de hidroterapia (detallado en el sub-apartado 3.3.3. “Protocolos de enriquecimiento ambiental” del apartado MÉTODOS EXPERIMENTALES del presente trabajo), utilizando agua corriente (canal de Isabel II, Madrid) (grupo CB, maduros con  $n=10$  y viejos con  $n=10$ ). Adicionalmente, un tercer grupo de animales se mantuvo estabulado en condiciones estándar, actuando como grupo control (grupo CC, maduros con una  $n=6$  o viejos con una  $n=7$ ).

## Material y métodos



**Figura 16.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo en ratones maduros y viejos. Se utilizaron ratones hembra ICR-CD1 maduras (12±1 meses de edad) y viejas (20±1 meses de edad) en dos experimentos que se realizaron de forma independiente pero que siguieron el mismo diseño. Un grupo de ratones se sometió a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (13 mg/L) (grupos SB, maduros o viejos, n=10) mientras que otro grupo de animales recibió la misma terapia de baños utilizando agua corriente (grupos CB, maduros o viejos, n=10). Así mismo, se incluyó un grupo de ratones, estabulados bajo condiciones estándar, como grupo control (grupos CC, maduros n=6 y viejos n=7). Tras 2 semanas, los animales realizaron una serie de pruebas conductuales para evaluar sus habilidades sensoriomotoras (reflejos visual y extensor posterior y “cuerda tirante”) y sus capacidades de exploración y conductas de ansiedad (“Campo abierto”, “prueba de esquinas”, “tablero de agujeros” y “laberinto T”). Posteriormente, se obtuvieron los leucocitos peritoneales donde se valoraron la actividad NK y la capacidad fagocítica de los macrófagos (esta última, sólo en ratones viejos), como parámetros de función inmunitaria, y las concentraciones intracelulares de ROS (producidos en presencia de PMA y látex) y de glutatión total, como parámetros de estrés oxidativo. CC: ratones control, CB: ratones bañados en agua corriente, SB: ratones bañados en agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, NK: *Natural killer*, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.

Tras realizar la hidroterapia durante 2 semanas, los ratones se sometieron a una batería de pruebas de conducta, durante 4 días consecutivos, y siguiendo la secuencia descrita a continuación. El primer día, se sometieron a pruebas para evaluar las capacidades sensoriomotoras, tales como la prueba de los reflejos visual y extensor posterior y la “cuerda tirante”. Los segundo, tercer y cuarto días realizaron pruebas para analizar sus capacidades de exploración y sus respuestas de ansiedad: “campo abierto” (día 2), “prueba de esquinas”

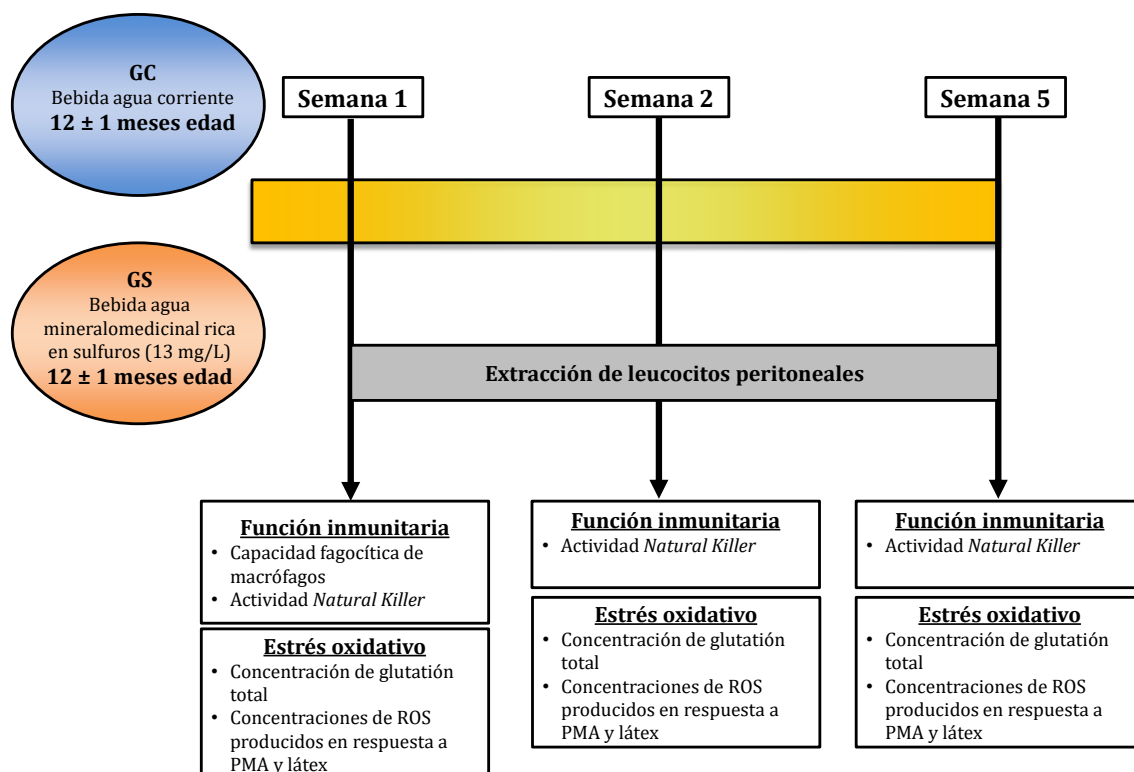
y “tablero de agujeros” (día 3) y “laberinto T” (día 4). Seguidamente, se obtuvieron los leucocitos peritoneales, en los que se evaluaron una serie de parámetros de función y de estrés oxidativo. En el caso del experimento llevado a cabo en maduros, se determinó la actividad citotóxica NK, como parámetro de función inmunitaria, y las concentraciones intracelulares de ROS (producidos en presencia de PMA y látex) y de glutatión total, como parámetros de estrés oxidativo. Con respecto a los viejos, en éstos se evaluaron la capacidad fagocítica de los macrófagos y la actividad citotóxica NK, como parámetros de función, y las concentraciones de ROS (producidos en presencia de PMA y látex) y de glutatión total en los leucocitos, como parámetros de estrés oxidativo.

### **3.2.5. Utilización de estrategias para mejorar la conducta de ratones con envejecimiento cronológico, así como la función y estrés oxidativo de sus leucocitos.**

#### *3.2.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.*

Se emplearon ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Harlan) maduras ( $12 \pm 1$  meses de edad), mantenidas en grupos de 4 individuos por jaula y marcadas con ácido pícrico para poder realizar su seguimiento de forma individualizada. Los animales del estudio fueron seleccionados al azar para formar dos grupos experimentales. Un grupo de 8 individuos bebió agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (13 mg/L), procedente del manantial “Sondeo Platea”, Calatayud, Zaragoza (D.U.P. (17/8/2006) (BOA 8/9/2006)) durante un tiempo máximo de 5 semanas (grupo GS). Paralelamente, otro grupo de 8 ratones bebieron agua corriente (Canal de Isabel II, Madrid), actuando como grupo control (grupo GC).

Se obtuvieron los leucocitos peritoneales pasadas 1, 2 y 5 semanas de bebida de agua mineralo-medicinal (o normal, en el caso de los controles), valorándose en ellos una serie de parámetros de función inmunitaria tales como la capacidad fagocítica de los macrófagos (analizada sólo en la semana 1) y la actividad citotóxica NK. Adicionalmente, se determinaron las concentraciones intracelulares de glutatión total y de ROS (producidos en presencia de PMA y látex), como parámetros de estrés oxidativo.



**Figura 17.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos de la bebida de un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros sobre parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones maduros. Un grupo de ratones hembra ICR-CD1 maduras (12±1 meses de edad) bebió durante 5 semanas un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (13 mg/L) (grupo GS, n=8) mientras que otro grupo de ratones de iguales edad y características bebió agua corriente, actuando como grupo control (grupo GC, n=8). Se obtuvieron los leucocitos peritoneales pasadas 1, 2 y 5 semanas. En estas células se evaluaron la capacidad fagocítica de los macrófagos (valorada sólo tras 1 semana) y la actividad citotóxica NK, como parámetros de función inmunitaria, y las concentraciones intracelulares de glutatión total y de ROS (producidos en presencia de PMA o látex), como parámetros de estrés oxidativo. GC: ratones control que beben agua corriente, GS: ratones que beben agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, NK: *Natural killer*, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.

### 3.2.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) viejos (17 ± 1 meses de edad) y adultos “intermedios” (9 ± 1 meses de edad). Los animales se mantuvieron estabulados en grupos, con un número máximo de 5 individuos por jaula. Además, se marcaron con ácido pícrico para su identificación y seguimiento individualizado.

Se establecieron tres grupos experimentales. Un grupo de ratones viejos se sometió a un tratamiento con el compuesto

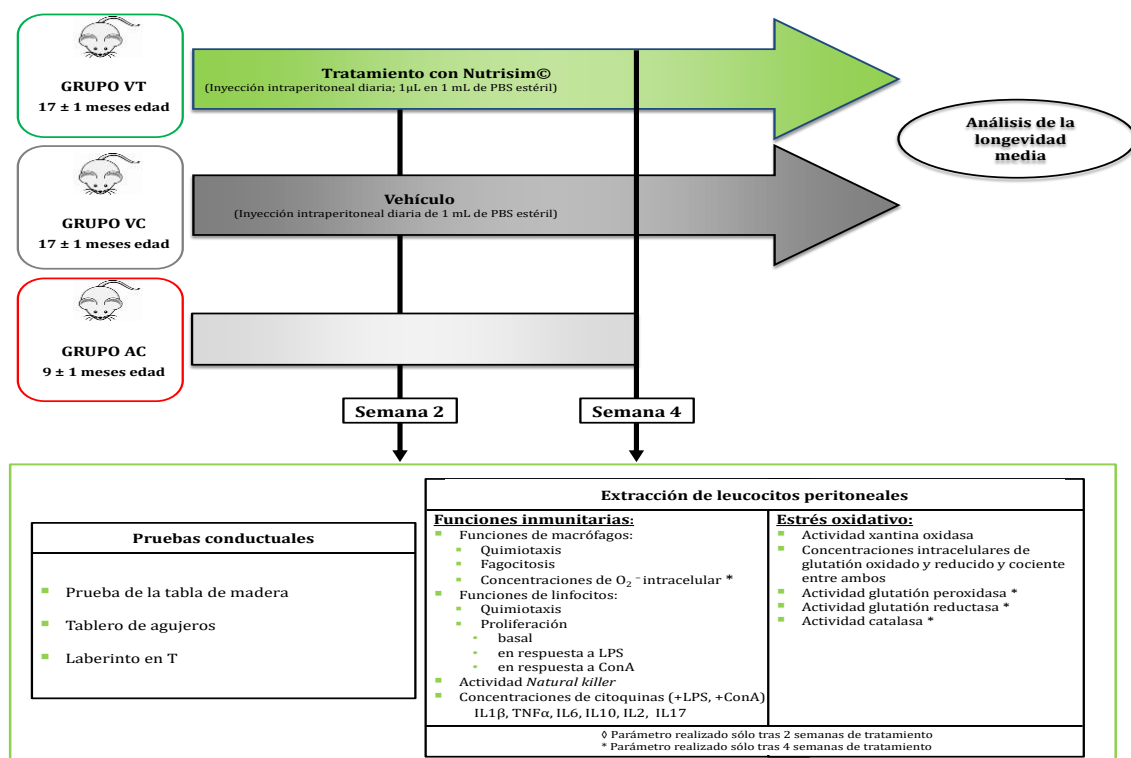


Nutrisim® (Biosim Laboratory, México) (grupo VT, n=10), que consistió en la inyección intraperitoneal diaria (entre las 15:00 y las 16:00 de la tarde) de 1 mL de una solución que contenía 1  $\mu$ L de Nutrisim® diluido en PBS estéril durante un tiempo máximo de 4 semanas. Durante este tiempo, a otro grupo de viejos se les inyectó intraperitonealmente, y también de manera diaria y en el mismo momento del día, 1 mL de PBS estéril, actuando como grupo control (grupo VC, n=10). Finalmente, un grupo de ratones hembra adultos “intermedios” fue incluido en el estudio, sin realizarle ningún tipo de manipulación, utilizándose como control de edad (grupo AC, n=10).

Tras 2 y 4 semanas de tratamiento, y previamente a los estudios en células inmunitarias, todos los animales se sometieron a una serie de pruebas conductuales durante 3 días consecutivos. El primer día, realizaron la prueba de la “tabla de madera”, para evaluar sus capacidades sensoriomotoras; mientras que los segundo y tercer días, se enfrentaron al “tablero de agujeros” y al “laberinto T” respectivamente, para estudiar la actividad exploratoria y algunas conductas de ansiedad. A continuación se obtuvieron los leucocitos peritoneales sobre los que se valoraron una serie de parámetros de función inmunitaria, como fueron las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la capacidad proliferativa basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK. Así mismo, también se determinaron la actividad de la enzima XO y el contenido intracelular de las formas oxidada (GSSG) y reducida (GSH) del glutatión, así como la relación entre ambas formas (cociente GSSG/GSH), como parámetros de estrés oxidativo. Adicionalmente, tras 4 semanas de tratamiento, se amplió el estudio valorándose las concentraciones intracelulares de anión superóxido producidos por los macrófagos (tanto basales como estimulados por látex) así como las actividades de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en los leucocitos peritoneales. De igual manera, y sólo tras 2 semanas de tratamiento, se determinaron en los sobrenadantes procedentes de los linfocitos cultivados en presencia de LPS y ConA las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17 secretados por estas células.

Una vez realizados los estudios conductual e inmunológico, los ratones viejos tratados con Nutrisim® (grupo VT) y los ratones viejos no tratados o controles (grupo VC) fueron mantenidos a lo largo de su vida en las condiciones estándar de estabulación, registrándose el momento en el que fallecieron por muerte natural para analizar

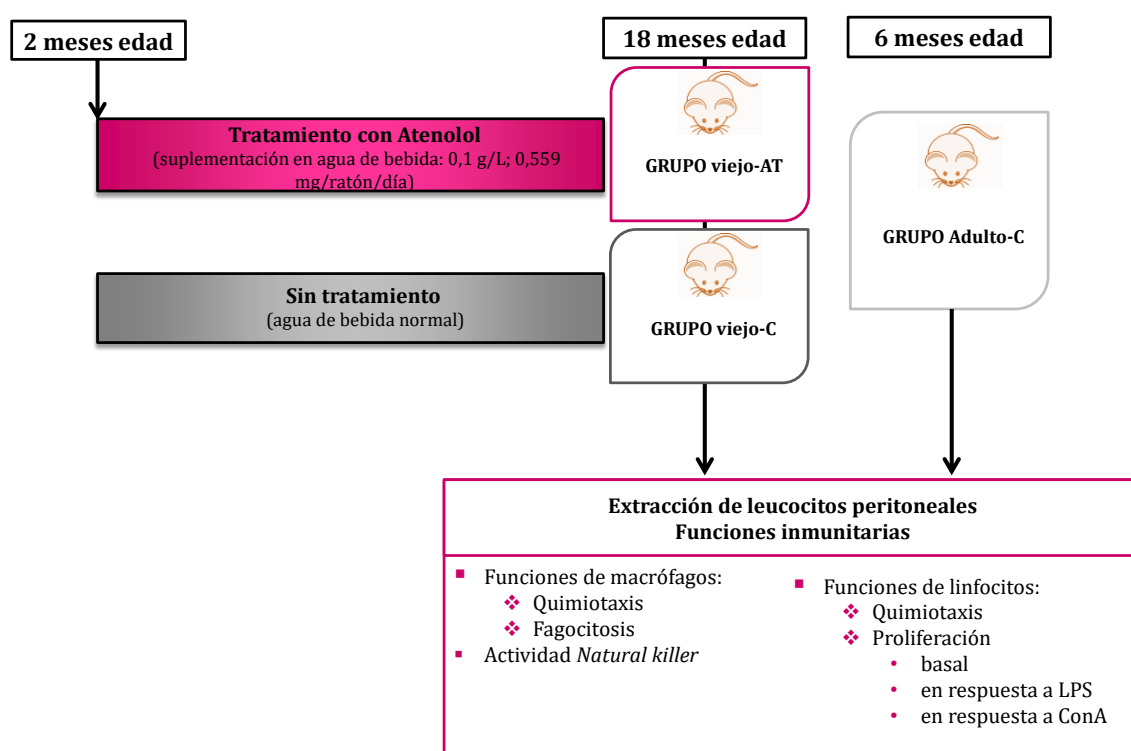
posteriormente los efectos de la intervención sobre la longevidad media.



**Figura 18.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta, la función y el estrés oxidativo de leucocitos y la longevidad en ratones viejos. Un grupo de ratones hembra ICR-CD1 viejas (17±1 meses de edad) se sometió durante un tiempo total de 4 semanas a un tratamiento con Nutrisim® (grupo VT, n=10). Paralelamente, un grupo de ratones de igual edad y características recibió un vehículo, conformando el grupo control (grupo VC, n=10). En el estudio se incluyó un tercer grupo de ratones “intermedios” adultos (9±1 meses de edad), que no recibieron ningún tipo de manipulación (grupo AC, n=10). Tras 2 y 4 semanas de tratamiento, los ratones se sometieron a las pruebas conductuales “tabla de madera”, “tablero de agujeros” y “laberinto T”, para evaluar sus capacidades sensoriomotoras y de exploración así como conductas de ansiedad. Además, en ambos puntos del tratamiento, se extrajeron los leucocitos peritoneales en los que se evaluaron parámetros de función inmunitaria (capacidad quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, quimiotaxis y proliferación basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y actividad citotóxica NK) y de estrés oxidativo (actividad enzimática xantina oxidasa, concentraciones intracelulares de glutatión oxidado y reducido y relación entre ambos). Adicionalmente, tras 4 semanas de tratamiento, se valoraron otros parámetros como fueron: las concentraciones intracelulares de anión superóxido de los macrófagos y las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa. Además, se analizaron las concentraciones de las citoquinas IL1β, TNFα, IL6, IL10, IL2 e IL17 en los sobrenadantes de los cultivos de leucocitos en presencia de LPS y ConA, tras 2 semanas de tratamiento. Finalmente, los ratones viejos se mantuvieron estabulados en condiciones estándar hasta su muerte natural, que se registró para analizar los efectos del compuesto sobre la longevidad media. VT: ratones viejos tratados con Nutrisim®, VC: ratones viejos controles (vehículo), AC: ratones adultos control, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

### 3.2.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.

Se partió de 16 ratones machos vírgenes de la cepa B6D2F1 (Harlan) y estabulados individualmente. A los dos meses de edad se establecieron, al azar, dos grupos experimentales. Un grupo de ratones recibió un tratamiento con atenolol (Sigma, A7655), que consistió en la adición de este compuesto en el agua de bebida alcanzando una concentración final de 0,1 g/L lo que supuso una ingesta media diaria de unos 0,559 mg de atenolol por ratón (grupo AT, n=8). Paralelamente, otro grupo de ratones (grupo C, n=8) no recibió este tratamiento, actuando como grupo control.



**Figura 19.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones viejos machos. Se utilizaron ratones machos de la cepa B6D2F1. Un grupo de ratones recibió desde los dos meses de edad un tratamiento con atenolol, incluyendo éste en el agua de bebida (0,1 g/L) mientras que otro grupo de ratones no recibió dicho compuesto, actuando como controles. Al alcanzar la vejez (18 meses de edad), todos los ratones del estudio (grupo tratado viejo-AT, n=8; grupo control viejo-C, n=8), además de un grupo de ratones control adultos de 6 meses de edad (grupo adulto-AC, n=8), se sacrificaron y se obtuvieron los leucocitos peritoneales, donde se valoraron la quimiotaxis y fagocitosis de los macrófagos, la capacidad quimiotáctica y la proliferación (basal y en presencia de los mitógenos LPS y ConA) de los linfocitos y la actividad citotóxica NK, como parámetros de función inmunitaria. Viejo-AT: ratones viejos tratados con atenolol, Viejo-C: ratones viejos control, Adulto-C: ratones adultos control, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

El desarrollo del diseño fue llevado a cabo por el equipo de investigación del Dr. Gustavo Barja, del Departamento de Fisiología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

El tratamiento se mantuvo hasta que los animales alcanzaron la vejez (18 meses de edad). En ese momento, los individuos de ambos grupos (grupo Viejo-AT y grupo Viejo-C) fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se obtuvieron las suspensiones peritoneales. Paralelamente, se incluyó un grupo de ratones macho, de la misma cepa, de edad adulta (6 meses de edad) de los cuales se obtuvieron, siguiendo la misma metodología, las suspensiones peritoneales, actuando como grupo control de edad (grupo Adulto-C, n=8).

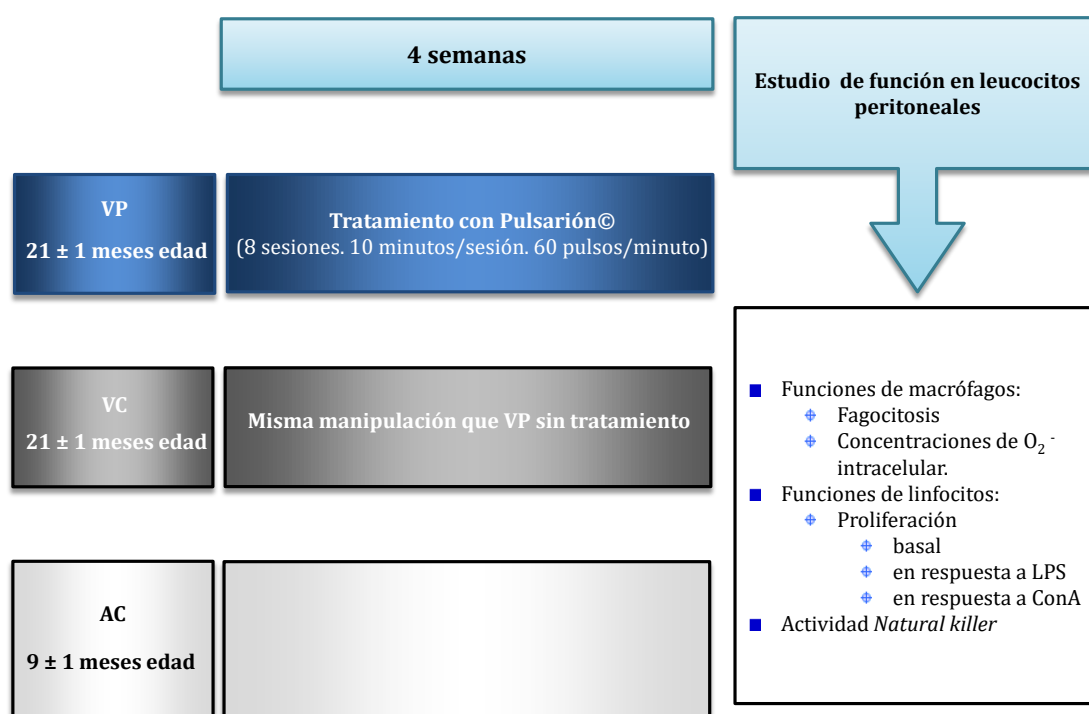
Las suspensiones de leucocitos peritoneales se utilizaron para valorar una serie de parámetros de función inmunitaria, como fueron las capacidades quimiotáctica y fagocítica de los macrófagos, la quimiotaxis y la respuesta de proliferación basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK.

#### *3.2.5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones viejos.*

Se utilizaron ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Harlan) viejas ( $21 \pm 1$  meses de edad) y adultas “intermedias” ( $9 \pm 1$  meses de edad). Los animales se mantuvieron estabulados en grupo, con un número máximo de 5 individuos por jaula. Así mismo, se marcaron con ácido pícrico, para llevar a cabo su identificación y seguimiento individualizados. Los ratones se seleccionaron al azar para establecer tres grupos experimentales. Un grupo de ratones viejos (grupo VP, n=7) se sometió a un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión®, de manera que cada ratón recibió de forma individualizada 8 sesiones de tratamiento de nanopulsos, de una duración de 10 minutos cada una de ellas y a una frecuencia de 60 pulsos por minuto, dos veces por semana durante 4 semanas. Dichas sesiones se realizaban siempre entre las 9:00 y las 11:00 coincidiendo con el periodo activo del animal y con el fin de evitar posibles interferencias en la intervención debidas al efecto del ritmo circadiano. De forma paralela, otro grupo de ratones se manipuló de forma similar (dejando al individuo solo en una jaula de idénticas dimensiones al del individuo sometido a la terapia durante 10 minutos) sin recibir la terapia de nanopulsos (grupo VC, n=5), actuando como grupo control.

Finalmente, se utilizó también un grupo de ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 adultas ( $9 \pm 1$  meses de edad) como control de edad (grupo AC,  $n=6$ ).

Pasadas las 4 semanas de tratamiento, se obtuvieron los leucocitos peritoneales, en los que se valoraron los siguientes parámetros de función inmunitaria: capacidad fagocítica y concentraciones intracelulares de anión superóxido (basales y estimuladas con látex) de los macrófagos, respuesta de proliferación de los linfocitos tanto basal como en respuesta a los mitógenos LPS y ConA y la actividad citotóxica NK.



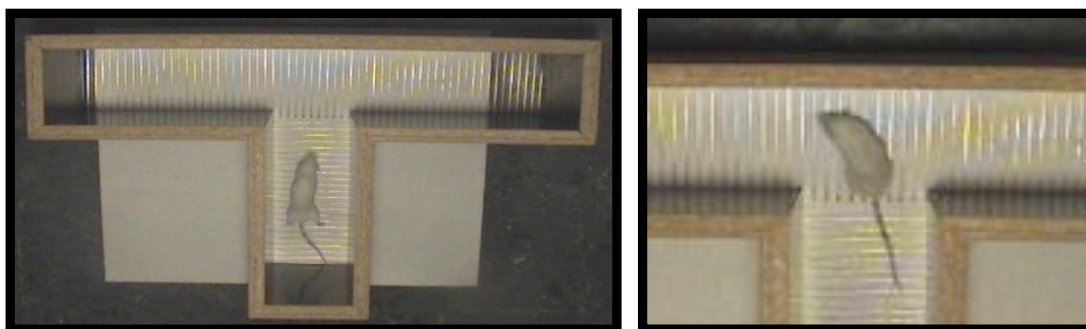
**Figura 20.** Esquema del diseño experimental seguido para el estudio de los efectos de un tratamiento con Pulsarión® sobre parámetros de función de leucocitos en ratones viejos. Un grupo de ratones hembra ICR-CD1 viejas ( $21 \pm 1$  meses de edad) recibió un tratamiento de nanopulsos con el Pulsarión® durante 4 semanas (frecuencia de 60 pulsos/minuto, sesión de 10 minutos, 2 sesiones por semana) (grupo VP,  $n=7$ ). Paralelamente un grupo de animales de iguales características y edad, se sometió a la misma manipulación sin recibir los nanopulsos, conformando el grupo control (grupo VC,  $n=5$ ). Se incluyó en el estudio un grupo de ratones adultos “intermedios” ( $9 \pm 1$  meses de edad), como control de edad (grupo AC,  $n=6$ ). Tras 4 semanas, se obtuvieron los leucocitos peritoneales donde se valoraron parámetros de función inmunitaria tales como la capacidad fagocítica y las concentraciones intracelulares de anión superóxido (basales y estimuladas con látex) de los macrófagos, la respuesta de proliferación basal y en respuesta a los mitógenos LPS y ConA de los linfocitos y la actividad citotóxica NK. VP: ratones viejos tratados con Pulsarión®, VC: ratones viejos control, AC: ratones adultos control, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

### 3.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1. Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM).

Para la obtención de los ratones PAM y NPAM utilizados a lo largo de la presente Tesis en diferentes diseños experimentales, se siguió una metodología establecida previamente por nuestro grupo de investigación (Guayerbas *et al.*, 2002a; Guayerbas y De la Fuente, 2003). Así, se partió de ratones hembra ex-reproductoras de la cepa ICR-CD1 (Janvier S.A.S.) adultas ( $7\pm 1$  meses de edad), que se mantuvieron estabulados en condiciones estándar y se marcaron con ácido pícrico para facilitar su seguimiento individualizado. Con el fin de seleccionar a los individuos PAM y NPAM dentro de una población normal de ratones adultos, todos los animales se sometieron a la prueba conductual “laberinto en T” una vez por semana durante 4 semanas consecutivas (4 sesiones en total). Cada sesión tuvo lugar el mismo día de la semana, a la misma hora (9:00-10:00) y en una ubicación silenciosa y bajo luz roja.

El aparato se trata de un laberinto con forma de T construido en madera y cuyas paredes, de color negro, tienen una altura de 19 cm. El brazo corto o vertical presenta una longitud de 27 cm mientras que el largo u horizontal mide 64 cm. Ambos brazos tienen una anchura de 10 cm. Así mismo, en la base de este aparato existen unas varillas metálicas (**Figura 21**).



**Figura 21.** Laberinto en T utilizado para la detección de PAM y NPAM.

Para la realización de la prueba no se utiliza ningún tipo de estímulo positivo o negativo para guiar la exploración del animal. La prueba consistió en colocar al ratón en el extremo del brazo corto del laberinto, mirando hacia la pared del mismo y dejando que el animal explore el aparato libremente. La prueba finaliza una vez que el ratón ha atravesado la intersección entre ambos brazos del aparato con las patas posteriores, momento en el que se determina el tiempo

requerido por cada individuo para ello. Una vez realizadas las 4 sesiones, aquellos individuos que han necesitado más de 10 segundos para atravesar la intersección del laberinto en cada una de las 4 pruebas se consideran ratones prematuramente envejecidos o PAM. Por el contrario, los ratones que han requerido menos de 10 segundos se consideran no prematuramente envejecidos o NPAM. Los animales que no cumplen ninguno de estos dos criterios se denominan adultos “intermedios”, que fueron utilizados como controles de edad adulta en algunos de los diseños del presente trabajo.

### 3.3.2. Protocolo de aislamiento social.

El protocolo de aislamiento social utilizado en la presente Tesis consistió en mantener al animal de experimentación en una jaula individual con las paredes forradas con plástico negro (**Figura 22**). De esta forma, el individuo no entra en contacto físico ni visual con ningún congénere pero sí puede recibir señales auditivas y olfativas del resto de animales que comparten la sala del estabulario donde son mantenidos.



**Figura 22.** Protocolo de aislamiento social seguido en la presente Tesis. El individuo aislado (en este caso, ratón) permanece estabulado en una jaula con las paredes forradas con plástico negro, las cuales impiden el contacto visual con los congéneres pero no el auditivo ni el olfativos.

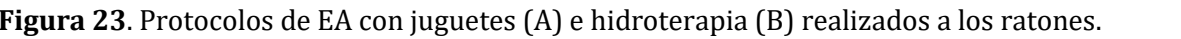
### 3.3.3. Protocolos de enriquecimiento ambiental

- **Enriquecimiento ambiental con juguetes:** el protocolo de enriquecimiento ambiental con juguetes empleado en la presente Tesis se basa en un método ya utilizado en nuestro laboratorio de investigación (Arranz *et al.*, 2010c). Éste consiste en introducir en la jaula de estabulación diversos objetos de distintas formas y texturas, que fueron intercambiados cada 2 días y siempre a la misma hora



[illegible]

- 



A la l'encara del presentat, la idea no ha estat considerada.



blanca de baja intensidad procedente de un foco de 20 W de potencia. En cada una de las pruebas a realizar, el individuo se posicionó en el punto del aparato considerado más neutro con el objetivo de paliar en la medida de lo posible el estrés. Así mismo, cualquier tipo de traza olfativa se evitó mediante la limpieza de la superficie de los aparatos tras cada prueba entre individuos. Las pruebas realizadas en cada diseño así como la secuencia temporal en la que se realizaron, se especifican en detalle en los correspondientes sub-apartados, dentro del apartado 3.2. “DISEÑOS EXPERIEMENTALES” del “MATERIAL Y MÉTODOS” de la presente Tesis.

### *3.3.4.1. Pruebas conductuales para evaluar las capacidades sensoriomotoras*

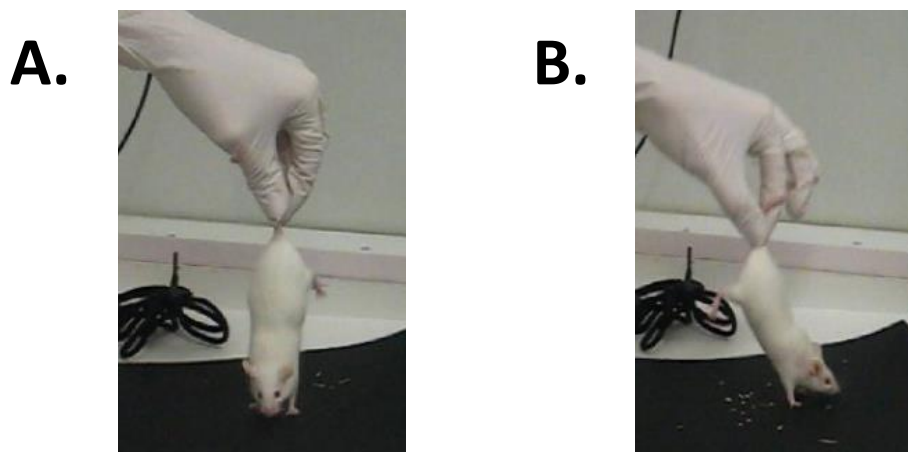
Con el fin de analizar las capacidades sensoriomotoras (reflejos visual y extensor posterior, equilibrio, coordinación motora, vigor muscular y tracción o prensilidad) se realizó la batería de pruebas que se detallan a continuación: prueba del reflejo visual, prueba del reflejo extensor posterior, prueba de la tabla de madera y prueba de la cuerda tirante, siguiendo una metodología previamente descrita (Baeza *et al.*, 2010)

#### **Prueba del reflejo visual**

Para la valoración del reflejo visual, se sujeta al animal firmemente por la parte basal de la cola y se suspende en el aire. A continuación, se le aproxima lentamente hacia una superficie plana de color oscuro (en este caso, se utiliza una cartulina de color negro). Esta prueba se realiza por triplicado. Si el individuo extiende totalmente las extremidades anteriores antes de contactar con la superficie de apoyo en los tres intentos, se considera una respuesta positiva e indicativa de que el animal conserva su capacidad visual intacta (**Figura 24A**).

#### **Prueba del reflejo extensor posterior**

Esta prueba se realiza de forma simultánea a la prueba del reflejo visual e, igualmente, por triplicado. Se considera una respuesta positiva si, al suspender en el aire al animal sujetado con firmeza por la zona basal de la cola, éste extiende completamente sus extremidades posteriores en cada uno de los tres intentos. Dicha respuesta positiva indicaría que el individuo conserva intacta la movilidad de su tren trasero (**Figura 24B**).



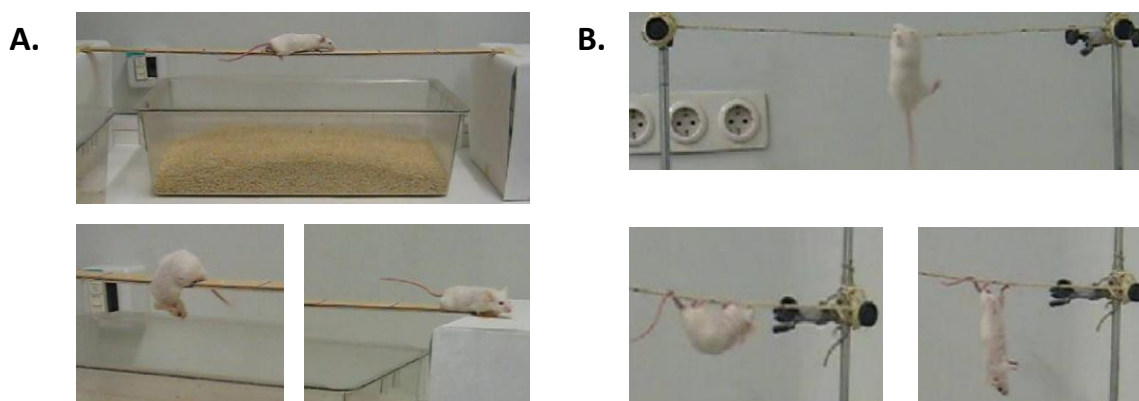
**Figura 24.** Reflejos visual (A) y extensor de las patas posteriores (B)

### **Prueba de la tabla de madera**

Con el objetivo de evaluar el equilibrio y la coordinación motora del individuo se llevó a cabo la prueba de la “tabla de madera”. La tabla utilizada presenta unas medidas de 80 cm de largo y 2,9 cm de ancho y se encuentra elevada 22 cm sobre un lecho de viruta, para evitar posibles daños al animal en el caso de que éste cayera de la misma. Además, dicha tabla se encuentra dividida en 10 segmentos de una longitud aproximada de 8 cm, coincidente con la longitud media de los ratones empleados (**Figura 24A**). Para la realización de la prueba, se coloca al animal en el centro de la tabla, mirando siempre al mismo extremo, y se suelta tras asegurarse de que éste se encuentra estable sobre la misma. La prueba se realiza en un único intento con una duración máxima de 60 segundos. Se considera que el animal completa la prueba cuando ha alcanzado uno de los extremos de la tabla.

Los parámetros que se registraron para valorar el equilibrio son: el porcentaje de animales que no caen del aparato y la latencia de caída o tiempo en el que se produce ésta (s). Adicionalmente, en algunos diseños, se valoró el porcentaje de animales que valoraban la altura a la que se encontraban, asomándose de forma significativa al borde de la tabla, así como la proporción de animales que, tras realizar esta valoración, decidían tirarse voluntariamente del aparato. Estos parámetros se denominaron “evaluación del riesgo” y “asunción del riesgo” y se consideraron no sólo indicativos de equilibrio sino también una conducta de ansiedad, pues valorar o asumir este riesgo podría apuntar a que el ratón presenta una conducta menos ansiosa o miedosa ante la situación estresante, buscando una salida alternativa al aparato. Con respecto a la coordinación motora, ésta se evalúa mediante el porcentaje de animales que recorren más de un segmento,

el número de segmentos recorridos en total durante la duración de la prueba, el porcentaje de animales que completan la prueba (esto es, cuando alcanzan uno de los extremos) y la latencia de llegada o tiempo que tardan en alcanzar uno de los extremos (s). Adicionalmente se registró el porcentaje de animales que realizan *freezing*, conducta en la que el animal no realiza ningún tipo de movimiento (ni siquiera mueve las vibrisas u olfatea el ambiente), considerándola como una respuesta ansiosa a la situación.



**Figura 24.** Pruebas de la tabla de madera (A) y de la cuerda tirante (B).

### **Prueba de la cuerda tirante**

La prueba de la cuerda tirante llevada a cabo se basa siguiendo un método previamente descrito (Miquel y Blasco, 1978), con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio, y permite evaluar el equilibrio, la coordinación motora así como la tracción de los animales, entendiendo ésta última como la capacidad del individuo de emplear distintas partes de su cuerpo (patas delanteras, patas trasera y cola) para asirse a la cuerda. El aparato consiste en una cuerda de cáñamo de 60 cm de longitud, dividida en 10 segmentos, que se coloca horizontalmente y tensa a una altura de 50 cm sobre un lecho de viruta. El animal se deja suspendido en el centro de la cuerda, asegurándose que se aferra con fuerza a la misma con sus patas delanteras (Figura 24B). Se lleva a cabo un ensayo previo de 5 segundos de duración para a continuación realizar la prueba definitiva, de una duración máxima de 60 segundos. La prueba se considera completada cuando el animal alcanza uno de los extremos de la cuerda, apoyándose en el soporte existente en ellos.

Durante este tiempo se registraron los siguientes parámetros indicativos de vigor muscular: el porcentaje de animales que no caen así como la latencia de caída o el tiempo en que se produce la misma

(s). Además, en algunos diseños, se tuvo en cuenta el porcentaje de animales que voluntariamente se soltaron de la cuerda, tras valorar la altura a la que se encontraban, denominándose este parámetro “asunción del riesgo”, considerándose indicativo de vigor muscular así como de una respuesta menos ansiosa (de igual manera que ocurría en la prueba de la “tabla de madera”). En relación a los parámetros de coordinación motora, se determinaron el porcentaje de animales que recorren más de un segmento, el número de segmentos recorridos en total durante la duración de la prueba, el porcentaje de animales que completan la prueba (esto es, cuando alcanzan uno de los soportes situados en cada extremo de la cuerda) así como el tiempo que tardan en completar la misma o la latencia de llegada (s). Además, con el fin de evaluar la tracción, se determinaron los porcentajes de animales que presentaron una prensilidad máxima u óptima (utilizando su cola y sus patas traseras y delanteras para aferrarse a la cuerda), media (aquellos que utilizaron dos de las tres posibles partes de su cuerpo) o mínima (cuando sólo emplearon una parte de su cuerpo).

Adicionalmente se registraron el porcentaje de animales que realizaron *freezing*, conducta en la que el animal realiza ningún tipo de movimiento (ni siquiera mueve las vibrisas u olfatea el ambiente) y considerada como una respuesta ansiosa a la situación, así como la latencia o el tiempo (s) que el animal tarda en salir del segmento en que se coloca para comenzar la prueba, directamente proporcional a los niveles de ansiedad del ratón.

### *3.3.4.2. Pruebas de exploración y respuestas de ansiedad*

En este apartado se incluyen aquellas pruebas que permiten valorar no sólo la conducta exploratoria, tanto espontánea como dirigida, sino también evaluar la emotividad y la conducta o respuestas de ansiedad del individuo.

#### **Prueba de las cuatro esquinas o de neofobia**

Esta prueba, también conocida como *Corner test*, permite evaluar la exploración y la respuesta de ansiedad del animal cuando éste se expone durante 30 segundos a un ambiente totalmente nuevo para él. La prueba consiste en colocar al animal en el centro de una jaula cuadrada (22 x 22 cm y 14,5 cm de altura) con lecho nuevo durante un tiempo máximo de 30 segundos. Tras cada prueba, el lecho se renovó para evitar cualquier traza olfativa que pudiera interferir en la conducta del siguiente individuo. Durante los 30 segundos de duración de la prueba, se registraron toda una serie de parámetros como son el

número de esquinas exploradas o visitadas (entendiendo como una exploración válida que el animal contacte, al menos con sus vibrisas, con la esquina), que se consideraría directamente proporcional a la capacidad de exploración y a una respuesta menos ansiosa ante el ambiente nuevo. Parámetros de exploración vertical, como el porcentaje de animales que presentan posición erguida o *rearing* (el individuo se yergue sobre sus patas traseras y cola sin apoyar o apoyando en alguna superficie sus patas delanteras) así como el número total de posiciones erguidas. Finalmente también se registró el porcentaje de animales que se acicalan (*grooming*) y el número total de acicalamientos, que podrían indicar una respuesta ansiosa.

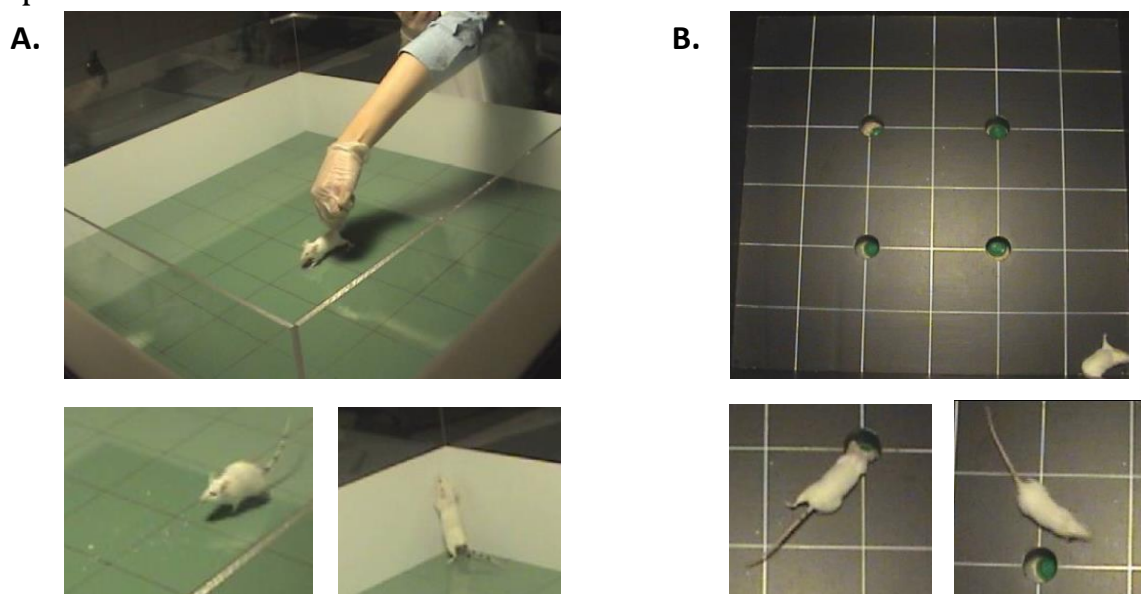
### **Campo abierto**

La prueba del campo abierto ha sido largamente usado para valorar la emotividad, la actividad exploratoria, la locomoción así como las respuestas de ansiedad en roedores (Hall, 1934; Broadhurst, 1969; Gray, 1979; Courvoisier *et al.*, 1996; Matto y Allikmets, 1999). El campo abierto (**Figura 25A**) consiste en un tablero cuadrado de 80 cm de lado, con paredes negras de 30 cm de altura y dividido en 64 cuadrantes de 10 x 10 cm. Los XX cuadrantes que componen el perímetro del tablero se consideran “cuadrantes externos” mientras que el resto se denominan “cuadrantes internos”. La prueba comienza colocando al ratón en el centro del tablero, de espaldas al manipulador, dejando que explore espontáneamente el entorno durante un tiempo total de 5 minutos. Durante este tiempo se registraron los siguientes parámetros:

- Latencia o tiempo (s) que el animal tarda en abandonar el punto central en que ha sido colocado, así como la latencia o tiempo (s) que tarda en alcanzar la zona periférica del tablero, que podrían indicar una mayor o menor respuesta de ansiedad a la situación.
- Parámetros de actividad exploratoria horizontal no dirigida o espontánea, que incluyen las deambulaciones (entendidas como la suma total de cuadrantes atravesados por el animal) total, externa, interna y media. Así mismo también se calculó la proporción de deambulación interna con respecto a la deambulación total, expresada en porcentaje. Teniendo en cuenta que los roedores presentan tigmotaxia (tendencia a desplazarse en contacto con una pared), la proporción de deambulación interna con respecto a la deambulación total podría estar inversamente relacionada con el

nivel de emotividad, siendo este parámetro evaluado para valorar los niveles de ansiedad del animal.

- Parámetros de actividad exploratoria vertical, tales como el porcentaje de animales que adoptan postura erguida, el número total de posiciones erguidas y el tiempo dedicado a esta conducta (s). Adicionalmente, en algunos diseños, se incluyó el porcentaje de animales capaces de realizar erguimiento central, aquel en el que el individuo no necesita apoyar sus patas delanteras para erguirse. Otros parámetros relacionados no sólo con la actividad exploratoria vertical sino también con la conducta de ansiedad fueron el porcentaje de animales que adoptan posición erguida y el número de posiciones erguidas durante el primer minuto de prueba, así como la latencia o el tiempo (s) hasta que el ratón se yergue por primera vez.



**Figura 25.** Prueba del campo abierto (A) y del tablero de agujeros (B).

- Finalmente, se evaluaron las conductas de acicalamiento y de defecación y urinaria, que podrían relacionarse con la respuesta de ansiedad del animal. Así se registraron el porcentaje de animales que se acicalan, el número total de acicalamientos, el tiempo (s) dedicado a esta conducta y la proporción de animales que se acicalan durante el primer minuto de la prueba. Además, se recabaron el porcentaje de animales que defecan, el número de bolas fecales y el porcentaje de individuos que orinan.

### **Tablero de agujeros**

La prueba del tablero de agujeros se ha utilizado para determinar la actividad exploratoria así como la locomoción (File y Wardill, 1975; Kliethermes y Crabbe, 2006). El tablero de agujeros (**Figura 25B**) consiste en un cuadrilátero abierto, con paredes de 45 cm de altura y una base cuadrada de 60 cm de lado. Tanto el suelo como las paredes del tablero están pintados en negro mate. La base cuadrada se encuentra dividida en 36 cuadrados de 10 cm de lado cada uno y delimitados por líneas de color blanco. Los 24 cuadrantes que componen el perímetro del tablero se consideran “cuadrantes externos”, mientras que los 4 cuadrantes del centro se denominan “cuadrantes internos”. El resto son considerados “cuadrantes medios”. Además, en la zona central de la base se observan 4 agujeros, equidistantes, de 3,8 cm de diámetro. Un objeto de plástico fue introducido en cada uno de estos agujeros con el fin de atraer la atención del animal. La prueba comienza colocando al ratón en uno de las esquinas del tablero, de espaldas al manipulador y dejando que explore libremente el entorno durante 5 minutos. Durante la duración de la prueba se registraron los siguientes parámetros:

- Parámetros de actividad exploratoria horizontal espontánea: deambulaciones total, externa, media e interna. Al igual que en el caso del “campo abierto”, se incluyó la proporción de deambulación interna con respecto a la total, expresada en porcentaje.
- Parámetros de actividad exploratoria vertical: porcentaje de animales que adoptan postura erguida, número total de posiciones erguidas y tiempo dedicado a esta conducta (s). Adicionalmente, y de forma similar a lo registrado en el campo abierto, se obtuvieron el porcentaje de animales capaces de realizar erguimiento central, el porcentaje de animales que adoptan posición erguida durante el primer minuto de prueba, así como la latencia o el tiempo (s) hasta que el ratón se yergue por primera vez.
- Parámetros para evaluar la actividad exploratoria de tipo dirigido o inquisitiva, que incluyen el porcentaje de animales que exploran los agujeros del tablero (se considera una exploración válida o *head-dipping* aquella en la que el animal introduce la cabeza en el interior del agujero), el número de exploraciones y el tiempo (s) dedicado a ello así como el tiempo (s) empleado por el animal en una exploración. Adicionalmente se registraron el porcentaje de ratones que exploran algún agujero y el número de exploraciones realizadas

durante el primer minuto de duración de la prueba y la latencia o tiempo (s) hasta que se produce la primera exploración.

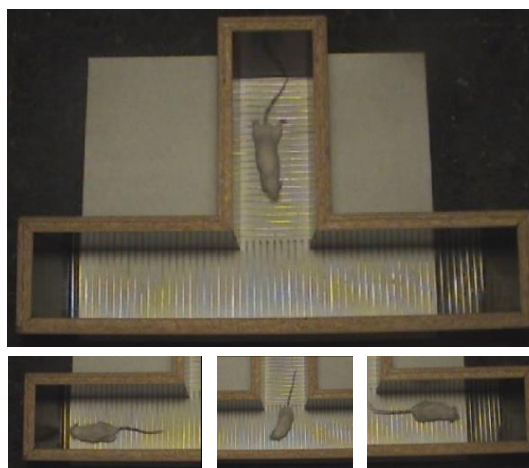
- Parámetros relacionados con las conductas de acicalamiento y de defecación y urinaria: porcentaje de animales que se acicalan, número de acicalamientos y tiempo (s) dedicado a esta conducta así como la proporción de animales que se acicalan dentro del primer minuto de la prueba, porcentaje de animales que defecan, número de bolas fecales y porcentaje de animales que orinan.

### **Laberinto en T**

Esta prueba, como las anteriores comentadas, tiene como finalidad no sólo evaluar la conducta de exploración del individuo sino también sus respuestas de ansiedad. Como se detalló en el subapartado 3.3.1. “Selección de ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) y no prematuramente envejecidos (NPAM)” del presente apartado DISEÑOS EXPERIMENTALES, el aparato es un laberinto con forma de T construido en madera y cuyas paredes tienen una altura de 19 cm. El brazo corto o vertical presenta una longitud de 27 cm mientras que el largo u horizontal mide 64 cm de longitud y ambos tienen una anchura de 10 cm. Así mismo, en la base de este aparato existen unas varillas metálicas (**Figura 26**).

Para la realización de la prueba no se utiliza ningún tipo de estímulo para guiar la exploración del animal. La prueba consiste en colocar al ratón en el extremo del brazo corto del laberinto, mirando hacia la pared del mismo. Hasta que el individuo complete la prueba, lo cual se considera cuando éste ha explorado en su totalidad el laberinto, se registran toda una serie de parámetros. Con el objetivo de evaluar la actividad exploratoria de tipo horizontal espontánea se registraron el tiempo (s) transcurrido hasta que el animal cruza con sus patas posteriores la intersección formada por los dos brazos del laberinto o “tiempo de cruce” así como la eficacia exploratoria, esto es, el tiempo (s) que tarda el individuo en explorar en su totalidad los tres brazos del laberinto. Con respecto a la actividad exploratoria vertical, se midieron el porcentaje de ratones que se colocan en posición erguida, el número total de erguimientos y el tiempo (s) dedicado a esta conducta. Además, se recabaron parámetros para estudiar las conductas de acicalamiento y defecación y urinaria, tales como el porcentaje de animales que se acicalan, el número de acicalamientos y el tiempo (s) dedicado a éstos, la proporción de ratones que defecan y orinan y el número de bolas fecales.





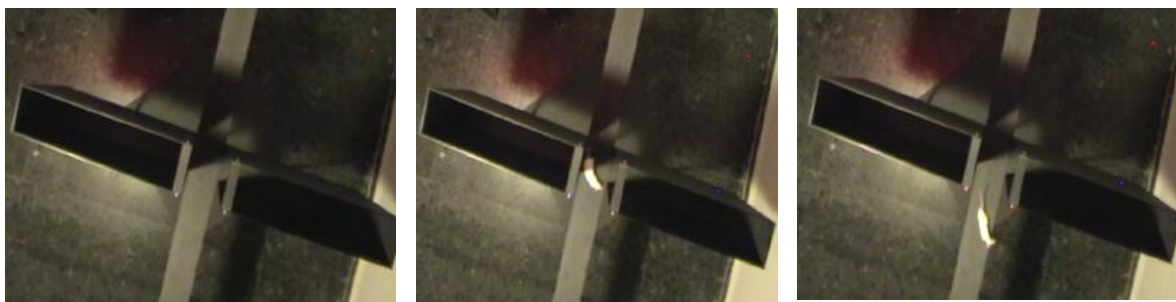
**Figura 26.** Prueba del laberinto en T.

### *3.3.4.3 Pruebas conductuales para determinar los niveles de ansiedad*

Este apartado recoge las pruebas llevadas a cabo para valorar de forma más específica la conducta de ansiedad del animal.

#### **Laberinto en cruz elevado**

La prueba del laberinto en cruz elevado (*Elevated plus maze* o EPM, en inglés) es característica para valorar la conducta de ansiedad ya que se basa en la aversión por las alturas y los espacios abiertos que caracteriza a los roedores. El laberinto en cruz elevado (**Figura 27**) es un aparato formado por dos brazos abiertos enfrentados de 50 cm de longitud y 10 cm de ancho y por dos brazos cerrados de iguales dimensiones en posición perpendicular a los brazos abiertos, también enfrentados entre sí y con paredes de 40 cm de altura. La confluencia de los cuatro brazos da lugar a un cuadrado central de 10 cm de lado. El aparato está construido en material plástico rígido de color azul mate y el suelo pintado de color negro mate y se encuentra elevado 62 cm del suelo por un soporte metálico de 8 patas. La prueba se realiza siguiendo el método desarrollado por otros autores (Pellow *et al.*, 1985) y comienza situando al animal en la zona central neutra del aparato, mirando hacia uno de los brazos cerrados, y dejando que explore libremente el laberinto durante un tiempo de 5 minutos (De Cabo *et al.*, 1995).



**Figura 27.** Prueba del laberinto en cruz elevado.

Durante la duración de la prueba se registran los siguientes parámetros:

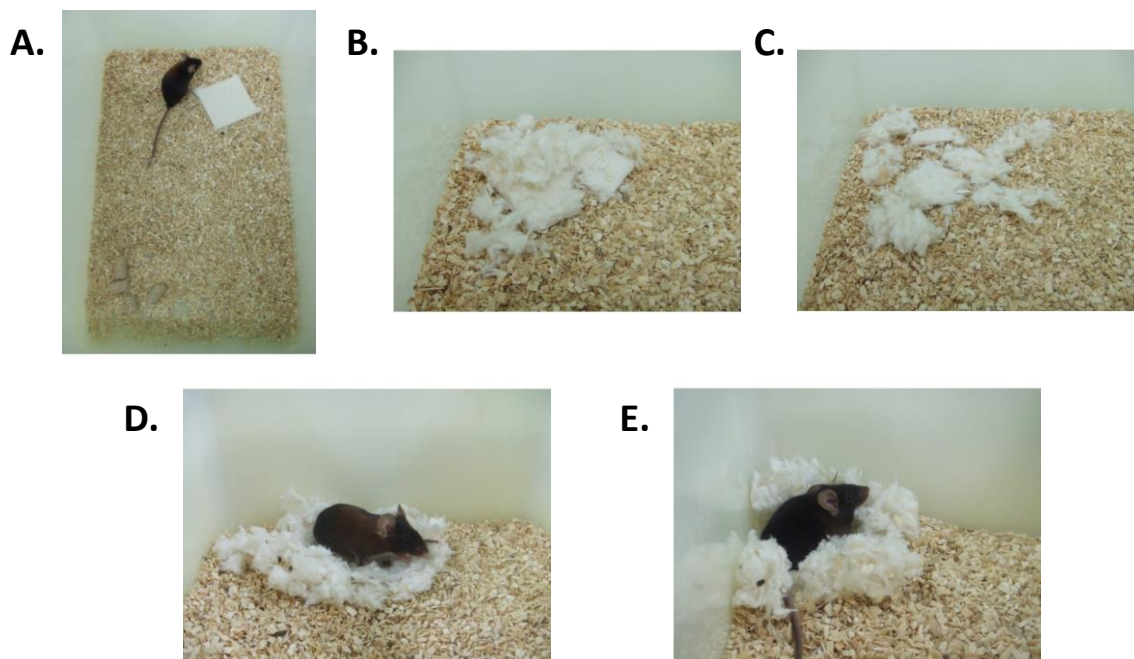
- Número de entradas en los brazos abiertos y en los brazos cerrados, entendiendo que el animal entra en un brazo cuando sus cuatro patas se hallan dentro de él y sale del mismo cuando saca, al menos, una de sus extremidades.
- Porcentajes de entradas en los brazos abiertos y en los brazos cerrados, que representa el número de entradas en cada tipo de brazo frente al número total de entradas realizadas.
- Tiempo en brazos abiertos y cerrados, o tiempo total (s) que el animal permanece en cada tipo de brazo durante la duración de la prueba.
- Porcentaje de tiempo en brazos abiertos y cerrados, que representa el tiempo que el animal permanece en cada tipo de brazo con respecto al tiempo total de duración de la prueba.
- Tiempo en la zona central o tiempo (s) que el animal permanece en la zona de confluencia de los cuatro brazos del aparato.

### **Prueba de la conducta de anidación**

La construcción de un nido se trata de una conducta natural para los roedores ya que esta estructura les proporciona refugio así como les ayuda a regular su temperatura corporal así como en la reproducción. Por lo tanto, si un individuo exhibe fallos en su conducta de anidación podría indicar problemas a nivel del sistema nervioso así como unos mayores niveles de ansiedad. Esta prueba se basa en la desarrollada por Deacon (2012) y para realizarla el animal ha de estar aislado y mantenido en condiciones estándar de estabulación durante la duración de la misma. Para ello, se coloca el animal en una jaula (tamaño estándar) a la que se le ha añadido previamente una capa de

lecho de un espesor aproximado de 0,5 cm. A continuación, se le proporciona material para la construcción del nido, en este caso será un cuadrado de algodón de 5 cm de lado. Durante 24, 48 y 72 horas se observa cómo evoluciona el nido dando en cada uno de estos tiempos una puntuación específica en base a la siguiente escala de Deacon (*Deacon's score*) (**Figura 28**):

- Puntuación o *score* 1: El material de construcción se encuentra entre un 90-100% intacto (**Figura 28A**).
- Puntuación o *score* 2: entre 50-90% intacto (**Figura 28B**)
- Puntuación o *score* 3: el material se encuentra prácticamente deshecho pero no se observa la estructura de un nido verdadero (**Figura 28C**).
- Puntuación o *score* 4: se observa un nido construido pero sus paredes no cubren al animal, lo que se conoce como “nido plano” o *flat nest* (**Figura 28D**).
- Puntuación o *score* 5: se observa un nido perfectamente construido que cubre al animal (**Figura 28E**).



**Figura 28.** Prueba de la conducta de anidación. Estadios de la escala de Deacon: puntuación 1 (A), puntuación 2 (B), puntuación 3 (C), puntuación 4 (D), puntuación 5 (E). Tomada de Deacon, 2012.

Adicionalmente se determinó la “capacidad de perfeccionamiento”, que vendría dada por el porcentaje de animales capaces de mejorar la estructura de su nido, es decir que aumentan su puntuación en la escala de Deacon, transcurridas 48 y 72 h y con respecto a las 24 h tras el inicio de la prueba.

### **Prueba del enterramiento de canicas**

La conducta de enterramiento es una conducta característica de los roedores dirigida, normalmente, a objetos potencialmente peligrosos o nocivos. Tanto en condiciones naturales como en el laboratorio, los roedores entierran todo aquello que les causa aversión valiéndose del hocico y las patas (De Boer y Koolhaas, 2003).

Previamente a la realización de la prueba, ha de aislarse al animal durante 24 horas proporcionándole material de enriquecimiento con el fin de paliar en la medida de lo posible el estrés que este aislamiento podría causarle. Para realizar la prueba se utiliza una jaula de tamaño estándar con una capa de lecho de 5 cm de espesor. La prueba se realiza durante dos días consecutivos en dos condiciones:

- Condición estándar (día 1), en la que se colocan dentro de la jaula 12 piezas (canicas) distribuidas uniformemente a lo largo de todo el lecho, siempre en la misma posición. A continuación se posiciona al animal en una esquina de la jaula y se permite que explore de forma espontánea el entorno durante un tiempo de 15 minutos.
- Condición bizonal (día 2), en la que las canicas se colocan 8 piezas o canicas sobre el lecho y únicamente en una de las mitades de la jaula. Tras posicionar al animal en una esquina de la zona sin canicas, se deja que éste explore espontáneamente el entorno durante 30 minutos.

En cada una de las pruebas se registró el número de canicas intactas, cambiadas de posición o enterradas (se entiende que el objeto está enterrado cuando el lecho está cubierto 2/3 partes de su tamaño). En el caso de que una pieza hubiera sido movida y enterrada, ambas interacciones se contabilizaron por separado. Adicionalmente, en la condición bizonal, se registraron la proporción de tiempo (%) que pasó el animal tanto en la zona sin canicas como en la zona con ellas, con respecto al tiempo total de duración de la prueba (en este caso, 30 minutos).

### 3.3.4.4. Evaluación de la actividad física voluntaria con la rueda de actividad.

Con el fin de estudiar la actividad física voluntaria, se introdujo en la jaula de estabulación una rueda de actividad (20 cm), adosada a una de las paredes internas. Diariamente se recabaron los datos relativos a la distancia recorrida (km), el tiempo de uso de la rueda (h) y las velocidades media y máxima (km/h) que pudieron ser medidos con la ayuda de un sensor magnético acoplado a la rueda de actividad (Pareja-Galeano, *et al.*, 2012; Smythe y White, 2012).

### 3.3.5. Obtención de muestras biológicas

#### 3.3.5.1. Obtención de órganos inmunitarios

Una vez sacrificado el animal, se extrajeron asépticamente el bazo y el timo y se depositaron en tubos estériles embebidos en medio PBS, también estéril. El procesamiento de los órganos se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- El bazo se dividió en dos fragmentos. Uno de ellos se procesó en fresco para la obtención de los leucocitos (método que se describirá en el sub-apartado 3.3.5.2. “Obtención de leucocitos esplénicos y tímicos. Recuento y viabilidad celular”, detallado a continuación), en los que se valoraron parámetros de funcionalidad inmunitaria. El otro fragmento se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C con el fin de emplearlo posteriormente en determinaciones de estrés oxidativo.
- El timo se destinó en su totalidad para valorar la funcionalidad inmunitaria, tras la pertinente obtención de los leucocitos tímicos (método que se describirá en el sub-apartado 3.3.5.2. “Obtención de leucocitos esplénicos y tímicos. Recuento y análisis de la viabilidad celular”, detallado a continuación).

#### 3.3.5.2. Obtención de leucocitos esplénicos y tímicos. Recuento y análisis de la viabilidad celular.

Tanto el fragmento de bazo como el timo se procesaron en fresco y en condiciones de esterilidad para la obtención de los leucocitos mononucleares siguiendo los siguientes métodos:

- **Bazo:** la fracción de bazo utilizada en fresco se maceró previamente en 3 mL de medio PBS estéril. Posteriormente, con el objetivo de

extraer los leucocitos mononucleares separadamente de los otros tipos celulares (mayoritariamente eritrocitos) se llevó a cabo un aislamiento de dichas células inmunitarias mediante un gradiente de densidad. Para ello, se depositó el macerado en un tubo de vidrio estéril de calibre 18 conteniendo 3 mL de Histopaque de densidad 1,077 g/mL. Su dispensación se realizó lentamente por las paredes del tubo para evitar la mezcla del macerado con el Histopaque. El tubo se centrifugó sin freno a 4°C durante 20 minutos a 840 g. Pasado este tiempo se recogió el halo conformado por los leucocitos mononucleares, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril. Esta suspensión celular fue transferida a un tubo de vidrio estéril de calibre 18, adicionando 5 mL de medio PBS estéril. A continuación, se realizó un lavado mediante una centrifugación a 4°C a 400 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el sedimento celular resultante se resuspendió en un volumen de 900 µL de medio PBS estéril y mantenido en hielo hasta su uso.

- **Timo:** para la obtención de los leucocitos tímicos, el órgano completo se maceró en 3 mL de PBS estéril y la suspensión resultante se transfirió directamente a un tubo de vidrio estéril de calibre 18, añadiendo 5 mL de PBS estéril. Seguidamente se realizó un lavado mediante centrifugación a 4°C y a 400 g, durante 10 minutos. Al ser un órgano constituido básicamente por células inmunitarias y prácticamente carente de eritrocitos, no fue necesario realizar un aislamiento previo mediante gradiente de densidad, como en el caso del bazo. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular fue resuspendido en 900 µL de medio PBS estéril y mantenido en hielo hasta su utilización.

### **Recuento y análisis de la viabilidad celular de leucocitos esplénicos y tímicos**

El cálculo del número de células vivas por mL (células/mL) de la suspensión de leucocitos esplénicos o tímicos, según corresponda, se realizó utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fase (objetivo 40x). Paralelamente, se valoró la viabilidad de la suspensión celular mediante el método de exclusión con el colorante vital azul tripán. Para ello, 10 µL de la suspensión celular se añadieron a 10 µL del colorante (proporción 1:1) y, a continuación, en el hemocitómetro, se contabilizaron las células vivas (no teñidas) y muertas (teñidas en color azul), obteniéndose la concentración de ambas. Este método de viabilidad se realizó de forma

rutinaria, sólo utilizándose aquellas suspensiones con una viabilidad igual a superior al 95%.

### *3.3.5.3. Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y análisis de la viabilidad celular.*

#### **Obtención de leucocitos peritoneales**

El protocolo de obtención de la suspensión de leucocitos peritoneales se llevó a cabo siguiendo un método previamente descrito (Guayerbas *et al.*, 2002a), que permite la extracción de los leucocitos sin necesidad de sacrificar al animal. La extracción tuvo lugar siempre a la misma hora y en la fase oscura del ciclo vital de los animales (8:30-12:00 horas), siguiendo el siguiente método:

- a) *Sujeción del animal*: con los dedos pulgar e índice se sujetó al ratón por la piel de la parte posterior de la cabeza; se le dio la vuelta, colocándolo boca arriba, y se inmovilizaron las patas posteriores sujetando la cola por su parte más anterior entre los dedos anular y meñique, y con la palma de la mano.
- b) *Inyección de un medio salino*: una vez inmovilizado el ratón, se inyectó intraperitonealmente un volumen de 3 mL de solución de Hank estéril, previamente atemperada a 37°C, y se masajeó suavemente el abdomen.
- c) *Obtención de la suspensión peritoneal*: Gracias al masaje abdominal, la suspensión peritoneal va saliendo por el mismo orificio en el que se practicó la inyección de la solución de Hank, recogién dose aproximadamente un 90% del volumen inyectado, el cual se depositó en un tubo de vidrio estéril que se mantuvo en todo momento en hielo.

#### **Recuento y análisis de la viabilidad celular de los leucocitos peritoneales**

Las células obtenidas del peritoneo son, fundamentalmente, leucocitos (macrófagos y linfocitos). Para su recuento, se utilizó un hemocitómetro de Neubauer y mediante microscopía óptica de fase (objetivo x40), se procedió al recuento de ambos tipos celulares diferenciándolos entre sí por su morfología característica, obteniendo el número de células vivas (macrófagos, linfocitos o leucocitos totales) por mL contenidas en la suspensión. La viabilidad de las células obtenidas y utilizadas para los distintos ensayos fue evaluada de forma paralela mediante el método de exclusión con el colorante vital azul

tripán, detallado anteriormente en el apartado 2.3.5.2. “Obtención de leucocitos esplénicos y tímicos. Recuento y análisis de la viabilidad celular” del presente trabajo. Para llevar a cabo los ensayos únicamente se utilizaron aquellas suspensiones con un porcentaje de viabilidad superior al 95%.

### *3.3.5.4. Obtención de linfocitos T peritoneales.*

La obtención de la subpoblación de linfocitos T peritoneales se llevó a cabo siguiendo un método previamente descrito por nuestro laboratorio (Puerto, 2004), basado en la diferente capacidad de adhesión de las células inmunitarias (Russo *et al.*, 1979) y fue utilizada para determinar el módulo elástico E, parámetro que indica la elasticidad de la membrana celular, en el primer objetivo de la presente Tesis. Para ello, tras la extracción de los leucocitos peritoneales descrita en el apartado 3.3.5.3. “Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y análisis de la viabilidad celular”, alícuotas de 200  $\mu$ L de la suspensión celular se dispusieron en cada uno de los ocho pocillos de una placa M.I.F., incubándose durante 45 minutos a 37°C, en una atmósfera con humedad saturante y enriquecida en un 5% con CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se obtiene una monocapa en la superficie de cada pocillo constituida básicamente por los leucocitos peritoneales con mayor capacidad adherente, predominantemente macrófagos y linfocitos B, mientras que en el sobrenadante se encuentran los linfocitos T, células que no se adhieren. Con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, dicho sobrenadante se recogió y se procedió al recuento y valoración de la viabilidad celular, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.5.3. “Obtención de leucocitos peritoneales. Recuento y análisis de la viabilidad celular” de la presente Tesis. Sólo se utilizaron aquellas suspensiones que presentaron una viabilidad igual o superior a un 95%. Aquellos sobrenadantes que cumplieron este requisito, fueron mantenidos en hielo hasta su uso.

### **Caracterización de la subpoblación de linfocitos T peritoneales mediante citometría**

Como método de control del grado de pureza de la suspensión de linfocitos T obtenida, se determinó el porcentaje de dicha subpoblación en el sobrenadante procedente de las placas M.I.F. mediante técnicas citométricas. Ello se llevó a cabo mediante el marcaje de los linfocitos T peritoneales con diversos anticuerpos monoclonales, de diversos antígenos de diferenciación leucocitaria (CD) presentes en la



membrana plasmática de las células. Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales, a las concentraciones que se indican:

- CD45 conjugado con peridincolorofil (PerCP) (0,05  $\mu\text{g}/10^6$  células)
- CD3 conjugado con aloficocianina (APC) (0,25  $\mu\text{g}/10^6$  células)
- CD19 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1  $\mu\text{g}/10^6$  células).

Tras obtener la suspensión de linfocitos T, ésta se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 mL de medio PBS-BSA (1%). El BSA disminuye la unión inespecífica por parte de los anticuerpos. Tras el recuento celular en el hemocitómetro de Neubauer, tal como se ha descrito anteriormente, se prepararon alícuotas de  $2 \times 10^5$  células peritoneales, que se emplearon para realizar el marcaje, basándose en la cantidad mínima necesaria de eventos o células necesarias para la cuantificación en el citómetro. Una vez preparadas, las suspensiones celulares ajustadas a la concentración adecuada, se centrifugaron a 580 g durante 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de la mezcla de anticuerpos mencionados anteriormente. De forma paralela, se prepararon los controles negativos o blancos (carentes de anticuerpos) así como los marcajes simples (usando un solo anticuerpo), que permitirán ajustar las condiciones del citómetro previamente a la adquisición de los datos. Todas las muestras se incubaron durante 30-45 minutos en frío y en oscuridad y, a continuación, se realizaron dos lavados en PBS-BSA centrifugando a 580 g durante 10 minutos con el objetivo de retirar el exceso de anticuerpo que haya podido quedar no unido. Finalmente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA a las muestras e inmediatamente se adquirieron en el citómetro de flujo (FACSCalibur Flow Cytometer, Becton Dickinson). Las células fueron seleccionadas en base a su tamaño (*forward scatter*) y complejidad (*side scatter*). El análisis de datos se realizó con ayuda del *software* Cell Quest Pro (BD Biosciences), obteniendo como resultado el porcentaje de células CD3+ (linfocitos T) con respecto al número de células CD45+ (leucocitos) presentes en cada suspensión.

### 3.3.6. Mantenimiento de la línea tumoral murina YAC-1.

Las células de la línea tumoral YAC-1 que se emplean para el ensayo de la actividad citotóxica NK, se mantienen congeladas en criotubos estériles, en una concentración entre 2 y 3 millones de

células. En ellos se incluyen las células tumorales, el medio completo (constituido por medio RPMI 1640 con rojo fenol enriquecido con un 10% con suero bovino fetal descomplementarizado y suplementado con un 1% con gentamicina) y el agente dimetil sulfóxido (DMSO), que preserva la integridad de las membranas celulares.

Un par de semanas antes de realizar el ensayo, se descongela un vial de células YAC-1, transfiriéndose todo el volumen a un tubo de plástico estéril. A continuación, las células se lavan a 400 g durante 5 minutos para eliminar el DMSO (tóxico a temperatura ambiente). Se desecha el sobrenadante, se añade al sedimento más medio completo y se lleva a cabo un segundo lavado durante 10 minutos a 400 g. De nuevo se decanta el sobrenadante y el sedimento de células tumorales se resuspende en medio completo. Finalmente, se transfiere todo el volumen a un frasco de cultivo estéril y se mantiene en condiciones de esterilidad en un incubador a 37°C de temperatura y en atmósfera con humedad saturante y un 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir el crecimiento de la línea tumoral y obtener un número de células suficiente para el momento en el que se vaya a realizar el ensayo de citotoxicidad. Durante este tiempo, se controla la viabilidad del cultivo (mediante el test de exclusión del colorante azul tripán) y se renueva el medio de cultivo cada 48 horas para permitir el crecimiento celular. Al cabo de unos días, cuando el cultivo sigue un crecimiento exponencial, se transfieren alícuotas de 2-3 millones de células a otros frascos en los que se añade medio completo fresco. De esta manera se asegura que las células tienen nutrientes suficientes para seguir creciendo, manteniendo altos índices de viabilidad.

En el momento del ensayo de citotoxicidad, se transfiere el contenido de un frasco de cultivo a un tubo estéril, se realiza un lavado a 400 g durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en 1 mL de medio RPMI 1640 sin rojo fenol (un medio carente de color empleado para realizar el ensayo colorimétrico) y se ajusta a la concentración de células correspondiente para realizar el ensayo de actividad citotóxica NK.

Una vez realizados los ensayos, las células YAC-1 no utilizadas, se vuelven a congelar en criotubos estériles. En ellos, se añade una alícuota que contenga entre 2 y 3 millones de células vivas que se completa hasta un volumen de 900 µL con medio completo y, por último, se adicionan 100 µL de DMSO. Estos criotubos se mantienen congelados a -80°C hasta el momento de realizar el siguiente ensayo.

### 3.3.7. Estudio de las funciones de las células inmunitarias

Dentro de las funciones inmunitarias valoradas a lo largo del presente trabajo, se incluyen la quimiotaxis o capacidad de movilidad inducida, la capacidad fagocítica y los niveles intracelulares de anión superóxido de los macrófagos, la actividad citotóxica NK, la capacidad de proliferación y los niveles de diversas citoquinas intracelulares o secretados por los leucocitos en cultivo.

#### 3.3.7.1. Capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis de los leucocitos

La valoración de la capacidad de movilidad inducida o quimiotaxis, tanto de los macrófagos y linfocitos peritoneales como de los leucocitos esplénicos y tímicos, se llevó a cabo siguiendo una técnica descrita por Boyden (1965) y Fontan *et al.* (1979), con ligeras modificaciones (De la Fuente *et al.*, 2000) basada en la capacidad de las células inmunitarias de migrar a través de un gradiente químico de un péptido formilado (fMLP) presente en las paredes bacterianas (Snyderman y Pike, 1984; Schubert y Muller, 1989). La técnica se realiza utilizando unas cámaras cilíndricas de metacrilato constituidas por dos compartimentos de iguales dimensiones (9 mm de diámetro interno y 13 mm de externo), separadas por un filtro poroso de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 3  $\mu\text{m}$ . En el compartimento inferior se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de una solución de péptido formilado a una concentración de  $10^{-8}$  M, actuando como sustancia quimioatrayente. En el compartimento superior se dispusieron 300  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular, bien de macrófagos o linfocitos peritoneales ajustada a  $0,5 \times 10^6$  células por mL, bien una suspensión de leucocitos esplénicos o tímicos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mL en solución de Hank o en medio RPMI 1640 sin rojo fenol, en función del diseño experimental correspondiente.

Las cámaras se incubaron durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera con humedad saturante y un 5% de  $\text{CO}_2$ . Tras esta incubación, los filtros, en cuya cara inferior habrán quedado retenidas las células que han migrado siguiendo el gradiente generado por la sustancia quimioatrayente, se fijaron y tiñeron siguiendo esta secuencia: 1) alcohol metílico al 50% durante 4 minutos, 2) alcohol etílico al 75% durante 4 minutos, 3) agua destilada durante 2 minutos y 4) colorante azur-eosina-azul de metileno durante 45 minutos, 5) lavado exhaustivo con agua destilada.

Posteriormente los filtros se colocaron en un cubreobjetos con la cara inferior hacia arriba y se protegieron con un cubreobjetos. Al

microscopio óptico mediante el objetivo de inmersión (100x), se contabilizó el número de células (macrófagos, linfocitos o leucocitos, según corresponda) que aparecen en 4 barridos de 5 mm, aproximadamente un tercio de la superficie del filtro. El valor en dicho recuento se denomina Índice de Quimiotaxis (I.Q.).

### *3.3.7.2. Capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales*

La valoración de la capacidad de los macrófagos peritoneales de ingerir material extraño o capacidad fagocítica se llevó a cabo utilizando como agente extraño bolas de látex de 1,091  $\mu\text{m}$  de diámetro diluidas al 1% en medio PBS y basándose en un método previamente descrito (De la Fuente, 1985). Previamente, se obtuvo una suspensión de macrófagos peritoneales ajustada a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  macrófagos por mL en solución de Hank. A continuación, se dispensaron 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión ajustada en cada pocillo de la placa M.I.F. y se incubaron durante 45 minutos (tiempo suficiente para que en la superficie plástica del pocillo se genere una monocapa de células con capacidad adherente constituida fundamentalmente por macrófagos) a 37°C en una atmósfera con humedad saturante y un 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se lavaron suavemente las placas con medio PBS atemperado a 37°C, para eliminar las células no adheridas, y a cada pocillo se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de Hank y 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión de látex al 1% en PBS. Las placas se incubaron en idénticas condiciones a las comentadas anteriormente durante 30 minutos y posteriormente se realizó un lavado exhaustivo de las mismas con medio PBS a 37°C, para eliminar las partículas de látex no fagocitadas. A continuación las células se fijaron con metanol al 50% durante 4 minutos y se tiñeron con Azur-eosina-azul de metileno 45 minutos. Finalmente, se lavaron exhaustivamente con abundante agua destilada para eliminar totalmente los restos de colorante y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se contabilizaron el número de partículas de látex ingeridas por 100 macrófagos seleccionados al azar, obteniéndose:

- Índice Fagocítico (I.F.): número de partículas de látex ingeridas por 100 macrófagos.
- Eficacia Fagocítica (E.F.): macrófagos que son capaces de ingerir al menos una partícula de látex, expresado en porcentaje.

### 3.3.7.3. Concentraciones intracelulares de anión superóxido de los macrófagos peritoneales.

Las concentraciones de anión superóxido ( $O_2^-$ ) son válidas para conocer la capacidad de los macrófagos para destruir material fagocitado. Este radical libre es el primero de una cadena que se produce en el estallido respiratorio, y que conduce a la digestión del material fagocitado (Babior, 1999). Los niveles de anión superóxido se midieron siguiendo el método de la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT), previamente descrito por Hedley y Currie (1978) con ligeras modificaciones (De la Fuente *et al.*, 1997). Este método se basa en la capacidad del anión para reducir el NBT, que es convertido en proporción equimolar en un formazán detectable mediante espectrofotometría (Bagasra *et al.*, 1988). En tubos de vidrio (diámetro de 0,5 cm) se dispensaron 250  $\mu$ L de una suspensión de macrófagos peritoneales ajustada en solución de Hank a  $1 \times 10^6$  células/mL, a los que se adicionaron 250  $\mu$ L de una solución de NBT (1mg/mL en solución de Hank). Seguidamente, se añadieron 50  $\mu$ L de una suspensión de partículas de látex (al 1% en medio PBS), para estudiar la reducción del NBT en presencia de un estímulo fagocítico (muestras estimuladas) y 50  $\mu$ L de solución de Hank para el estudio de los niveles basales de anión superóxido (muestras basales o no estimuladas). Pasados 60 minutos de incubación en baño con agitación suave a 37°C, la reacción se detuvo añadiendo 2,5 mL de ácido clorhídrico 0,5 N a cada tubo. Posteriormente, se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 1600 g. A continuación, se desechó el sobrenadante y al sedimento resultante se le adicionó 1 mL de dioxano para lisar las células y, así, extraer el formazán formado (NBT reducido) intracelularmente. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, las absorbancias de los sobrenadantes se determinando a 525 nm mediante espectrofotometría empleando cubetas de vidrio de 10 mm de paso óptico. Las medidas se extrapolaron en una curva patrón, utilizando ditioeritrol como agente reductor del NBT, obteniéndose la concentración de anión superóxido intracelular en nmol/ $10^6$  células.

### 3.3.7.4. Actividad citotóxica Natural Killer de los leucocitos.

La llamada citotoxicidad natural o NK permite a las células inmunitarias destruir de forma espontánea, sin existir una sensibilización previa ni presencia de anticuerpos, células tumorales. En la presente Tesis se valoró la capacidad citotóxica o NK de los

leucocitos peritoneales, esplénicos y tímicos. Para ello, se utilizaron como células diana células pertenecientes a la línea tumoral YAC-1 de linfoma murino, las cuales se mantienen almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se descongelan y cultivan antes de su utilización (según la metodología ya descrita en el sub-apartado 3.3.5.5. “Mantenimiento de la línea tumoral mutina YAC-1”).

Para determinar la actividad NK se utilizó un kit colorimétrico comercializado (Cytotox 96, PROMEGA) siguiendo la metodología previamente descrita por Ferrández *et al.* (1999). Este método se basa en la detección y valoración de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), liberada al sobrenadante por las células lisadas. Las células diana (células tumorales YAC-1), previamente cultivadas, se lavaron a 400 g durante 10 minutos. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640 sin rojo fenol, evitando así posibles interferencias en la posterior detección colorimétrica, y se comprobó la viabilidad celular mediante el test de exclusión del colorante azul tripán. A continuación, se ajustó el número de células diana a una concentración de  $10^5$  células vivas/mL en medio RPMI sin rojo fenol. Así mismo, las células efectoras (leucocitos) se ajustaron a una concentración de  $10^6$  células/mL, obteniéndose una relación efectoras:diana de 10:1.

Una vez ajustadas ambas suspensiones celulares, se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células efectoras en placas de 96 pocillos con fondo en “U”, a los que se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células diana. Además, se incluyeron pocillos en los que únicamente se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de células diana, para cuantificar la lisis espontánea y total de las mismas; del mismo modo, se incluyeron otros pocillos que contenían únicamente 100  $\mu\text{L}$  de células efectoras, para así obtener su lisis espontánea. Estos pocillos se completaron con 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI 1640 sin rojo fenol. A continuación, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 250 g para favorecer los contactos celulares y se incubó durante 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura en una atmósfera con humedad saturante y un 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcurridas 3 horas t 15 minutos de incubación, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de solución de lisis (Tritón X-100), proporcionada por el kit comercial, en los pocillos destinados a cuantificar la lisis total de las células diana. Completadas las 4 horas de incubación, la placa se centrifugó en las condiciones anteriormente mencionadas y se recogieron 50  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes de todos los pocillos, que se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo plano para permitir la posterior medida en el lector de placas. A continuación, a cada pocillo se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de

una mezcla de sustratos de la enzima LDH (lactato, diaforasa y NAD+) y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se paró la reacción añadiendo a cada pocillo 50 µL de una solución de parada proporcionada por el kit y se midió la absorbancia a 490 nm.

Finalmente, se calculó el porcentaje de lisis con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\% \text{lisis} = \frac{(\text{lisis problema} - \text{lisis espontánea}_{\text{efectoras}} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}})}{(\text{lisis total} - \text{lisis espontánea}_{\text{diana}})} \times 100$$

siendo,

- Lisis problema: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos donde se incubaron células efectoras junto con células diana.
- Lisis espontánea: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos sembrados sólo con células efectoras o con células diana.
- Lisis total: media de las absorbancias obtenidas en los pocillos que contenían células diana, a los que se añadieron 20 µL de solución de lisis (Tritón X-100).

En cada experimento, los ensayos se realizaron por triplicado, utilizándose en la ecuación el valor medio de las absorbancias obtenidas para cada tipo de lisis.

### 3.3.7.5. Capacidad proliferativa de los leucocitos

La actividad más característica de los leucocitos es su capacidad de respuesta proliferativa a antígenos o mitógenos. Para estudiarla, se empleó el test de transformación linfoblástica (TTL) en respuesta a mitógenos, siguiendo una metodología previamente estandarizada (Del Río *et al.*, 1994; De la Fuente y Victor, 2000). Este ensayo analiza *in vitro* la respuesta proliferativa frente a mitógenos que reproduce la que tiene lugar *in vivo* frente a antígenos. Su fundamento reside en la capacidad de los linfocitos maduros de transformarse, en las condiciones adecuadas, en células con capacidad de división o linfoblastos. Éstos sintetizan ADN para su división, por lo que añadiendo un precursor de la síntesis marcado radiactivamente, en este caso se usa timidina marcada con tritio (<sup>3</sup>H-timidina), puede cuantificarse el crecimiento celular.

Para llevar a cabo el estudio de la capacidad proliferativa de los leucocitos esplénicos, tímicos y peritoneales, se trabajó en todo momento bajo condiciones de esterilidad y se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano. Previamente, la suspensión celular se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL o  $1 \times 10^6$  linfocitos/mL, según corresponda, utilizando medio completo. Una vez ajustada, se dispensaron 200  $\mu$ L de la suspensión por pocillo. En aquellos pocillos destinados a evaluar la respuesta proliferativa frente a mitógenos, se añadieron 20  $\mu$ L del mitógeno LPS, obteniéndose una concentración de éste de 1  $\mu$ g/mL en el pocillo, o bien 20  $\mu$ L del mitógeno ConA, con una concentración final de 1  $\mu$ g/mL. Previamente se comprobó que dichas concentraciones de ambos mitógenos producen una estimulación de la respuesta de proliferación óptima. Así mismo, en aquellos pocillos en los que se quiso valorar la proliferación basal o espontánea, se añadieron 20  $\mu$ L de medio completo.

La placa se incubó durante 48 horas a una temperatura de 37°C y en atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturante. Pasado este tiempo, se recogieron 100  $\mu$ L del sobrenadante de cada pocillo para valorar posteriormente los niveles de diversas citoquinas. A continuación, se añadieron 5  $\mu$ L de <sup>3</sup>H-timidina en cada pocillo (0,5  $\mu$ Ci/pocillo) y se renovó el medio adicionando 100  $\mu$ L de medio completo fresco. Tras 24 horas más de incubación en las condiciones anteriormente mencionadas, las células contenidas en cada pocillo se recolectaron, con la ayuda de un recolector semiautomático, en filtros. Éstos se dejaron secar al aire y, una vez secos, se transfirieron a unos viales que contienen 5 mL de líquido de centelleo. Posteriormente, la radiactividad de la <sup>3</sup>H-timidina incorporada en el ADN de los leucocitos y linfocitos durante su crecimiento *in vitro* se cuantificó en un contador  $\beta$  de centelleo, obteniéndose las cuentas por minuto (cpm) de cada filtro.

En cada experimento, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron utilizando el valor medio de las cpm de cada triplicado. Así mismo, en algunos casos, se calculó la capacidad de estimulación proliferativa de los mitógenos utilizados relacionando las cpm obtenidas en la proliferación basal o espontánea, a las que se les otorga un valor de 100, y las cpm obtenidas en la proliferación estimulada con LPS o ConA, expresando el resultado como un porcentaje.



### *3.3.7.6. Concentraciones de citoquinas determinados mediante técnicas de luminometría a partir de cultivos de leucocitos.*

Las citoquinas son importantes moduladores de la compleja red de interacciones que regulan la respuesta inmunitaria. Por ello, en el presente trabajo y en diversos diseños se han valorado los niveles de varias citoquinas, tanto secretadas al medio por los leucocitos en cultivo como las intracelulares contenidas en dichas células inmunitarias. Además, dichas valoraciones se realizaron cultivando los leucocitos durante 48 h, en condiciones de no estimulación (basal) como de estimulación por los mitógenos LPS y ConA.

En la presente Tesis, se determinaron los niveles de citoquinas secretadas al medio por leucocitos esplénicos de rata así como los niveles de citoquinas secretadas e intracelulares en leucocitos peritoneales de ratón. La valoración de los niveles de citoquinas se llevó a cabo mediante luminometría, empleándose un kit comercializado “Milliplex® Map” de alta sensibilidad (MILLIPORE), que permite la detección simultánea de varias citoquinas (MULTIPLEX) en una misma muestra. La técnica empleada se basa en la utilización de una mezcla de anticuerpos monoclonales, específicos frente a los metabolitos (en este caso, citoquinas) que se desean valorar, cada uno de ellos unido a un número de microesferas magnéticas diferente, que pueden ser detectados en una misma reacción gracias a su clasificación mediante precisas relaciones entre dos fluoróforos. Para cuantificar la interacción entre ambas moléculas, se emplea una tercera molécula indicadora unida a un tercer fluoróforo.

### **Determinación de las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos esplénicos de rata en cultivo**

En el caso del análisis de los niveles de citoquinas secretadas por los leucocitos esplénicos de ratas macho viejas, sub-objetivo 3.b de la presente Tesis, se valoraron 4 citoquinas: IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL10 e IL2.

Tras 48 horas de incubación en ausencia (basal) o presencia de LPS y ConA (véase el sub-apartado 3.3.6.5. “Capacidad proliferativa de los leucocitos” del presente trabajo), se recogieron los sobrenadantes de los cultivos en presencia de los estímulos. Éstos fueron congelados y mantenidos a -80°C hasta su utilización. Previamente a la realización del ensayo, los alícuotas se descongelaron en frío y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 g, con el fin de eliminar posibles restos celulares y agregados.

En primer lugar, se humedecieron los 96 pocillos de la placa en la que se realizó el ensayo y ésta se mantuvo en agitación durante 10 minutos. A continuación, y tras eliminar en su totalidad el líquido con ayuda de una bomba de vacío, se añadieron 25 µL de los sobrenadantes de los leucocitos esplénicos en cultivo tras 48 horas. Así mismo, 25 µL de los controles y estándares fueron adicionados en los pocillos correspondientes. Seguidamente, en cada pocillo se dispuso la mezcla de anticuerpos conjugados con microesferas (25 µL), previamente sonicada en baño. La placa se incubó durante 16-19 horas a una temperatura de 4°C y en agitación. Pasado este tiempo, la placa se lavó y 25 µL de la solución de detección, conteniendo el conjugado anticuerpo-biotina, se añadieron a cada pocillo. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente y en agitación constante, se adicionaron 25 µL de una solución de estreptavidina-ficoeritrina a toda la placa y se incubó durante 30 minutos más en agitación, oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos lavados y se añadieron a cada pocillo 150 µL del fluido adecuado para pasar las muestras por el luminómetro (Luminex 200™). Los resultados se expresaron como pg/mL con ayuda del software de análisis de datos Luminex 100 Integrated System 2.3. Este kit tiene mayor sensibilidad y rango de linealidad que los ELISAs convencionales y sus características se especifican en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Características generales del MULTIPLEX utilizado para determinar las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos esplénicos de rata cultivados en presencia de los mitógenos LPS y ConA.**

Citoquina	Mínimo de detección pg/mL	Precisión intra-ensayo (%)	Precisión inter-ensayo (%)
IL1β	2,32	3,6	11,3
IL2	3,67	3,2	13,3
IL10	5,41	3,8	9,0
TNFα	4,44	2,7	10,8

IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

### **Determinación de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos peritoneales de ratón**

Las citoquinas generadas por los leucocitos peritoneales de ratón en cultivo en condiciones basales o de estimulación con LPS y ConA, que se valoraron a lo largo del presente trabajo, fueron: IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL2 e IL17.

#### *Concentraciones de citoquinas secretadas al medio de cultivo por los leucocitos peritoneales*

Transcurridas 48 h de incubación, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de los leucocitos peritoneales en ausencia de estímulo (condición basal) y en presencia de LPS y ConA (véase el sub-apartado 3.3.6.5. “Capacidad proliferativa de los leucocitos” del presente trabajo). Éstos se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### *Concentraciones de citoquinas intracelulares contenidas en los leucocitos peritoneales en cultivo*

Para la determinación de las citoquinas tanto secretadas o extracelulares como intracelulares en los leucocitos peritoneales, se utilizó el mismo cultivo para obtener la “fracción extracelular” (conteniendo las citoquinas secretadas por las células al medio”) y la “fracción intracelular” (que contendría las citoquinas presentes en el interior de las células en cultivo”) con el fin de reducir la posible variabilidad en los datos finales.

Así, alícuotas de 200 $\mu$ L de la suspensión de leucocitos peritoneales ajustada a 10<sup>6</sup> células/mL fueron dispensadas en placas de 96 pocillos, teniendo por cada individuo un pocillo de proliferación basal (sin estímulo), un pocillo al que se añadió LPS y un último pocillo conteniendo ConA, siguiendo la metodología descrita en el sub-apartado 3.3.6.5. “Capacidad proliferativa de los leucocitos” del presente trabajo. Tras 48h, se obtuvo la “fracción extracelular” recogiendo 100 $\mu$ L del sobrenadante de cultivo de cada condición (basal, con LPS o con ConA). En cuanto a la “fracción intracelular”, con ayuda de un raspador (Sigma), se levantó el cultivo celular y se pasó a un tubo eppendorff. Posteriormente, se centrifugaron a 1000g durante 10 min y 4°C, y el sobrenadante fue eliminado. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 100  $\mu$ L de medio completo y, seguidamente, se sonicaron durante 3 ciclos de 20 segundos con

descansos de 20 segundos entre ciclo y ciclo a una potencia de 75%. A continuación, las muestras se centrifugaron nuevamente a 1000g durante 10 min y 4°C, y con sumo cuidado de no levantar el sedimento, se recogieron los sobrenadantes. Ambas fracciones, “extracelular” e “intracelular”, se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Los niveles de las citoquinas anteriormente mencionadas (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , IL10, IL2 e IL17) secretadas al medio de cultivo o presentes en la “fracción extracelular” así como los de las contenidas en la “fracción intracelular” de los cultivos de leucocitos peritoneales de ratón se determinaron siguiendo una metodología común, que se explica a continuación:

Previamente, se humedeció el filtro situado en el fondo de la placa de 96 pocillos en la que se valorarán las citoquinas. A continuación se añadieron 25  $\mu$ L de los sobrenadantes de los leucocitos peritoneales cultivados durante 48 horas en presencia de LPS o ConA. Así mismo, se dispusieron 25  $\mu$ L de los controles y estándares en los pocillos correspondientes. Seguidamente se añadieron 25  $\mu$ L de la mezcla de anticuerpos conjugados con microesferas magnéticas, previamente sonicada en baño. La placa se incubó durante 18-20 horas, en oscuridad, a una temperatura de 4°C y con agitación suave. Tras el tiempo de incubación, la placa se lavó y se eliminó el líquido restante con ayuda de un lavador magnético manual (Biorad), tras lo cual se añadieron a cada pocillo 25  $\mu$ L de una solución de detección, que contiene anticuerpos conjugados con biotina. Tras una incubación de 1 hora de duración a temperatura ambiente con agitación, se añadió estreptavidina conjugada con ficoeritrina (25  $\mu$ L por pocillo) para permitir la cuantificación. Tras 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, la placa se lavó y el líquido sobrante se eliminó. A continuación, se añadieron a cada pocillo 150  $\mu$ L del fluido que permite pasar las muestras por el luminómetro (Luminex 200™). Los resultados se expresaron como pg/mL con ayuda del software de análisis de datos Luminex 100 Integrated System 2.3. Este kit tiene mayor sensibilidad y rango de linealidad que los ELISAs convencionales y sus características se especifican en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Características generales del MULTIPLEX utilizado para determinar las concentraciones de citoquinas secretadas e intracelulares por los leucocitos peritoneales de ratón cultivados en estado de reposo o basal o en presencia de los mitógenos LPS y ConA.**

Citoquina	Mínimo de detección pg/mL	Precisión intra-ensayo (%)	Precisión inter-ensayo (%)
IL1 $\beta$	5,4	2,5	5,8
IL2	1,0	1,5	3,8
IL6	1,1	2,3	5,4
IL10	2,0	1,4	5,1
IL17	0,5	2,0	5,8
TNF $\alpha$	2,3	2,6	9,3

IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

### 3.3.8. Estudio de parámetros de estrés oxidativo

#### 3.3.8.1. Actividad de la enzima Xantina Oxidasa

La enzima xantina oxidasa (XO) es clave en el catabolismo de las purinas. Esta enzima cataliza la oxidación de las bases de purina a ácido úrico en una reacción en la que los ROS se encuentran entre los productos finales.



Para la valoración de la actividad XO se llevó a cabo un ensayo fluorométrico, utilizando el kit comercializado *Amplex Red Xantina/Xantina oxidase* (Invitrogen). Este método se basa en la capacidad de la XO para catalizar la oxidación de la xantina, produciéndose ácido úrico y anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ). En esta reacción, el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  genera peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de forma espontánea que, en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), reacciona con el *Amplex Red Reagent* (reactivo facilitado por el kit), generando un compuesto oxidado fluorescente, la resorfurina, cuya emisión máxima de fluorescencia puede medirse aproximadamente entre 571 y 585 nm.

Para el estudio de la actividad XO en bazo, el tejido se homogeneizó a una concentración de 50 mg/mL en tampón fosfato dipotásico 50 mM pH 7,4 con EDTA 1 mM, utilizando un homogeneizador eléctrico a bajo número de revoluciones (300 rpm) y dentro de una cámara fría, para asegurar una temperatura de 4°C. Tanto los homogeneizadores como las muestras se mantuvieron en hielo a lo largo de todo el proceso. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 45 minutos y a una temperatura de 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes, en los que se valoró la actividad XO.

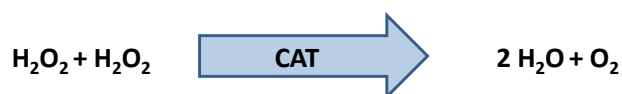
Para la determinación de la actividad XO en células inmunitarias, se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 110 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 con EDTA 1 mM. A continuación, las células se lisaron por congelación-descongelación a -20°C.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos negra (NUNC), en la que se dispusieron 50  $\mu$ L de las muestras, de los estándares de XO (de concentraciones conocidas) y de los controles positivo (solución de  $H_2O_2$  10  $\mu$ M) y negativo (tampón fosfato 50 mM pH 7,4 con EDTA 1 mM, para órganos o células según el caso) en los pocillos correspondientes. Seguidamente, se añadió a cada pocillo una mezcla de reactivos, *Amplex Red Reagent* + 0,4 U/mL de HRP + xantina 200  $\mu$ M, preparada en el tampón de ensayo específico, proporcionados todos ellos por el kit. La placa se agitó suavemente y se incubó un mínimo de 30 minutos a 37°C y en oscuridad. Finalmente, se realizó la lectura de la fluorescencia a unas longitudes de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 595 nm. A partir de las rectas estándares de actividad XO se calcularon los niveles de actividad de la enzima y los resultados se expresaron como mU.I./mg tejido, en el caso del bazo, o como mU.I./ $10^6$  células.

### 3.3.8.2. Actividad de la enzima Catalasa

La actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) de los leucocitos peritoneales se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Beers y Sizer (1952), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (Alvarado *et al.* 2006a; 2006b). Dicha técnica se basa en el descenso de la absorbancia a 240 nm por unidad de tiempo, debido a la

descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la actividad de la enzima:



Para la valoración de la actividad CAT en las células inmunitarias, se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 1100 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se desechó el sobrenadante, y el sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM pH 7,4, previamente desoxigenado burbujéandolo con helio durante 10 minutos. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos a una potencia máxima del 75% con 20 segundos de reposo entre ciclos) y se centrifugaron durante 20 minutos a 3200 g, realizándose el ensayo en el sobrenadante. Paralelamente, se preparó en el momento una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  14 mM con tampón fosfato 50 mM pH 7,4, previamente burbujeadado con helio, que se mantuvo en hielo y en oscuridad. Para realizar las medidas de la actividad enzimática se utilizaron microcubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, en las que se adicionaron:

- Muestra problema: 670  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  14 mM + 30  $\mu\text{L}$  de muestra
- Blanco: 670  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  14 mM + 30  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM pH 7,4

Se estudió la cinética de la reacción llevando a cabo la medida en espectrofotómetro a 240 nm y temperatura ambiente, desde su inicio cada 20 segundos y durante un tiempo total de 80 segundos, dado el corto intervalo de tiempo en que se produce la desactivación de la enzima. Los resultados se expresaron como unidades internacionales (U.I.) de catalasa por  $1 \times 10^6$  células [ $\text{U.I.} = 1/(\mu\text{mol } \text{H}_2\text{O}_2/\text{cm})$ ] y fueron calculados según la siguiente ecuación:

$$\text{U.I. CAT}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (10^6/X)$$

Siendo,

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ : incremento de la  $A_{240\text{nm}}$  por minuto en la reacción.

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta ( $700/30=23,33$ ).

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm ( $43,6 \times 10^{-3} \text{ mM cm}^{-1}$ ).

X: número de células equivalente a los 30  $\mu\text{L}$  de muestras valorados ( $3 \times 10^5$  células).

### 3.3.8.3. Concentraciones de Glutación reducido y Glutación oxidado. Cociente GSSG/GSH o índice redox.

El glutatión es un compuesto tiólico intracelular con una elevada capacidad antioxidante, conferida por la acción reductora del grupo tiol de su cisteína. La valoración de este compuesto, tanto en estado reducido (GSH) como oxidado (GSSG), y la obtención de la relación GSSG/GSH, nos permite determinar el grado de oxidación que presenta la muestra, ya que este cociente se considera un buen estimador del nivel de estrés oxidativo de los tejidos (Viña, 1990; Jones, 2002).

La determinación de los niveles de ambas formas del glutatión: oxidado (GSSG) y reducido (GSH) se realizó mediante fluorometría, siguiendo una técnica descrita previamente (Hissin y Hilf, 1976) con modificaciones (Mate *et al.*, 2015) adaptada para llevarla a cabo en placa de 96 pocillos y con ligeras modificaciones. El método se basa en la capacidad de reaccionar del GSSG a pH 12 y del GSH a pH 8 en presencia del o-phtalaldehído (OPT), dando lugar a un compuesto fluorescente en ambos casos.

Para la valoración de las concentraciones de GSSG y GSH intracelulares en las células inmunitarias, la suspensión celular se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 1100 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se desechó el sobrenadante, y el sedimento celular se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 100 mM con EDTA 50 mM pH 8. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos a una potencia máxima del 75% con 20 segundos de reposo entre ciclos) y se adicionaron 450  $\mu\text{L}$  del tampón de ensayo además de 5  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) al 60%. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 9500 g durante 10 minutos a 4°C.

Para la medida de los niveles de GSSG, en una placa negra de 96 pocillos, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra así como idéntico volumen de los estándares (de concentraciones de GSSG conocidas) y de los controles en los pocillos correspondientes. Seguidamente, se dispensaron 12  $\mu\text{L}$  de N-etilmaleimida 0,04 M (NEM), con el fin de prevenir la interferencia del GSH en la medición, y la placa se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se dispensaron 178  $\mu\text{L}$  de hidróxido sódico 0,1 N (NaOH) pH 12,5 y 20  $\mu\text{L}$  de una solución de OPT a una concentración



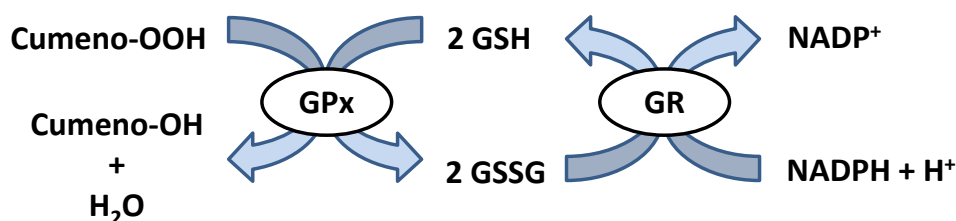
de 1 mg/mL en metanol. La placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se determinó la fluorescencia emitida por cada pocillo a unas longitudes de onda de 350 nm de excitación y 420 nm de emisión.

Para la medida del contenido intracelular de GSH, a los 10 µL de sobrenadante de la muestra, controles y estándares (de concentración de GSH conocida) dispensados en una placa negra de 96 pocillos, se añadieron 190 µL de tampón fosfato 100 mM con EDTA 50 mM pH 8 y 20 µL de OPT (1 mg/mL en metanol). Tras incubar la placa durante 15 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente, la fluorescencia emitida por cada pocillo se midió a las longitudes de onda de 350 nm de excitación y 420 nm de emisión.

Los niveles de GSSG y GSH intracelulares se obtuvieron interpolando el valor obtenido de la fluorescencia en la correspondiente recta patrón, realizada con los estándares de GSSG o GSH de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como nmol de GSSG/ $10^6$  células y nmol de GSH/ $10^6$  células. Adicionalmente, se obtuvo la relación entre las dos formas del glutatión, calculando el cociente GSSG/GSH que, como se ha comentado anteriormente, se considera un buen indicador del estado de oxidación celular.

#### 3.3.8.4. Actividad de la enzima Glutatión Peroxidasa

La valoración de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se realizó según la técnica de Lawrence y Burk (1976) con ligeras modificaciones (Alvarado *et al.* 2006b), a través de la cual se mide la actividad total de la enzima utilizando como sustrato el hidroperóxido de cumeno (cumeno-OOH). Mediante este método se determina la tasa de oxidación del GSH producida por el cumeno-OOH, en una reacción catalizada por la enzima GPx, gracias al descenso de la absorbancia a 340 nm por la oxidación del NADPH, en presencia de un exceso de la enzima glutatión reductasa (GR):



El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) también es un sustrato de la GPx. Sin embargo, si se utilizara este compuesto para la valoración de su actividad, únicamente se mediría la actividad de la GPx dependiente de

Selenio, presente de forma mayoritaria en la mitocondria y el retículo endoplasmático. Por tanto, usando en este método el cumeno-OOH como sustrato, se determina la actividad total de la enzima.

Para valorar la actividad de la GPx en el bazo, el tejido se homogeneizó a una concentración de 50 mg/mL en tampón fosfato dipotásico 50 mM pH 7,4, previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. Para ello, se utilizó un homogeneizador eléctrico a bajo número de revoluciones (300 rpm), con el fin de evitar el calentamiento de las muestras. Todo el procedimiento se realizó dentro de la cámara fría a una temperatura de 4°C y, tanto los homogeneizadores como las muestras, se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200 g durante 20 minutos y a una temperatura de 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes, en los que se valoró la actividad GPx.

En el estudio de la actividad de la GPx en células inmunitarias, se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 1100 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 200  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM pH 7,4, previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos a una potencia máxima del 75% con 20 segundos de reposo entre ciclos) y se centrifugaron durante 20 minutos a 3200 g, realizándose el ensayo en el sobrenadante.

Para el ensayo se prepararon en el momento de su uso las siguientes soluciones:

- Solución reactiva preparada en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (específico para órganos o células, según corresponda), conteniendo EDTA 1 mM, Azida sódica 4 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 4 mM, GR 1 U/mL. Se burbujeó con helio previo a su uso, manteniéndose en oscuridad.
- Cumeno-OOH 0,71 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (para órganos o células, según el caso).

Es necesario considerar que la reacción entre el cumeno-OHH y el GSH puede producirse aún en ausencia de la enzima GPx. Para evitar una posible sobrevaloración de dicha actividad enzimática, se realizó una reacción en ausencia de muestra, que se denominó reacción no catalizada y permitió la cuantificación de dicha reacción espontánea.

Las medidas se realizaron en microcubetas de vidrio óptico con paso óptico de 10 mm conteniendo:

- Reacción catalizada: 650  $\mu\text{L}$  de solución reactiva + 25  $\mu\text{L}$  de muestra + 25  $\mu\text{L}$  de solución de cumeno-OOH. Como blanco se empleó una mezcla formada por 675  $\mu\text{L}$  de solución reactiva y 25  $\mu\text{L}$  de muestra.
- Reacción no catalizada: 650  $\mu\text{L}$  de solución reactiva + 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (para órganos o células, según corresponda) + 25  $\mu\text{L}$  de solución de cumeno-OOH. En este caso, el blanco utilizado contenía 675  $\mu\text{L}$  de solución reactiva y 25  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (específico de órganos o células, según el caso).

Antes de añadir el cumeno-OOH, ambas reacciones se incubaron durante 5 minutos a 37°C y los reactivos fueron atemperados a temperatura ambiente para alcanzar unas condiciones óptimas de medida de la reacción. Ésta se inició tras la adición del volumen correspondiente de la solución de cumeno-OOH en la cubeta, monitorizándose el descenso de la absorbancia a 340 nm a partir de ese momento cada 40 segundos y durante un tiempo total de 5 minutos.

El cálculo de la actividad GPx se realizó según las expresiones que se indican a continuación, expresándose los resultados en unidades internacionales de actividad GPx por mg de tejido (U.I./mg tejido) [ $\text{U.I.} = 1/(\mu\text{mol NADPH}/\text{cm})$ ], en el caso de los órganos, o bien miliunidades internacionales por  $10^6$  células (mU.I./ $10^6$  células) [ $\text{mU.I.} = 1/(\text{nmol NADPH}/\text{cm})$ ], en el caso de los leucocitos:

$$\text{U.I. GPx/mg tejido} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (1000/Y)$$

$$\text{mU.I. GPx}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (10^6/X)$$

Siendo,

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ : incremento final de la  $A_{340\text{nm}}$  ( $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción catalizada -  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción no catalizada).

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta ( $700/25=28$ ).

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ( $6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Y: concentración inicial del homogenado de órgano (50 mg/mL).

X: número de células equivalente a los 25  $\mu\text{L}$  de muestra valorados ( $1,25 \times 10^5$  células).

### 3.3.8.5. Actividad de la enzima Glutación Reductasa

La actividad glutación reductasa (GR) se valoró según el método de Massey y Williams (1965), basado en el seguimiento espectrofotométrico de la oxidación del NADPH a 340 nm. La enzima GR cataliza la reducción del GSSG a GSH:



En el estudio de la actividad de la GR en el bazo, el tejido se homogeneizó a una concentración de 50 mg/mL en tampón fosfato dipotásico 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4, previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. La homegenización se realizó con ayuda de un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (300 rpm), con el fin de evitar el calentamiento de las muestras. Todo el procedimiento se realizó dentro de la cámara fría a una temperatura de 4°C y, tanto los homogeneizadores como las muestras, se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200 g durante 20 minutos y a una temperatura de 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes, en los que se valoró la actividad GR.

Para valorar la actividad GR en células inmunitarias, se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 1100 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4, previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos a una potencia máxima del 75% con 20 segundos de reposo entre ciclos) y se centrifugaron durante 20 minutos a 3200 g, realizándose el ensayo en el sobrenadante.

Para el análisis de la actividad enzimática, se realizó de forma paralela una reacción en ausencia de muestra o reacción no catalizada, que permitió la cuantificación de la oxidación espontánea de los componentes susceptibles a ello.

Las medidas se llevaron a cabo en microcubetas de vidrio óptico con un paso óptico de 10 mm conteniendo:

- Reacción con muestra o catalizada: 580  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4 (específico de órgano o células, según corresponda) + 50  $\mu\text{L}$  de muestra + 35  $\mu\text{L}$  de GSSG 80 mM + 35  $\mu\text{L}$  de NADPH 6 mM. El blanco empleado consistió en 650  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM (para órgano o células, según el caso) + 50  $\mu\text{L}$  de muestra.
- Reacción sin muestra o no catalizada: 630  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4 (específico de órgano o células) + 35  $\mu\text{L}$  de GSSG 80 mM + 35  $\mu\text{L}$  de NADPH 6 mM. En este caso, el blanco utilizado contenía 700  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4 (específico de órgano o células, según corresponda).

Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, monitorizándose el descenso de la absorbancia a 340 nm cada 40 segundos y durante un tiempo total de 4 minutos, con un retardo inicial de 30 segundos.

El cálculo de la actividad GR se llevó a cabo aplicando las expresiones que se indican a continuación. Los resultados se expresaron como unidades internacionales de actividad GR por mg de tejido (U.I./mg tejido) [ $\text{U.I.} = 1/(\mu\text{mol NADPH/cm})$ ], en el caso de los órganos, o bien miliunidades internacionales por  $10^6$  células (mU.I./ $10^6$  células) [ $\text{mU.I.} = 1/(\text{nmol NADPH/cm})$ ], en el caso de los leucocitos:

$$\text{U.I. GR/mg tejido} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (1000/Y)$$

$$\text{mU.I. GR}/10^6 \text{ células} = [(\Delta\text{DO}/\text{min}) \times F / \epsilon] \times (10^6/X)$$

Siendo,

$\Delta\text{DO}/\text{min}$ : incremento final de la  $A_{340\text{nm}}$  ( $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción con muestra o catalizada -  $\Delta\text{DO}/\text{min}$  reacción sin muestra o no catalizada).

F: factor de dilución de la muestra en la cubeta ( $700/50 = 14$ ).

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ( $6,22 \times 10^{-3} \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Y: concentración inicial del homogenado de órgano (50 mg/mL).

X: número de células equivalente a los 50  $\mu\text{L}$  de muestra valorados ( $5 \times 10^5$  células).

### 3.3.8.6. Concentración intracelular de Glutación Total

Como se ha comentado anteriormente, el glutatión es un compuesto intracelular con una elevada capacidad antioxidante.

Los niveles de glutatión total (GT), constituido fundamentalmente por GSH, se valoraron en bazo siguiendo la metodología previamente descrita por Tietze (1969), con ligeras modificaciones realizadas en nuestro laboratorio para órganos (Baeza *et al.*, 2010) y leucocitos peritoneales (De la Fuente *et al.*, 2004b). Dicho método se fundamenta en el reciclado enzimático, donde el GSH es secuencialmente oxidado por el DTNB y reducido por el NADPH, en presencia de la enzima GR:



Para la determinación del contenido de glutatión total o GT en órgano, el tejido fue homogeneizado a una concentración de 50 mg/mL en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en tampón fosfato 50 mM pH 7,4 dipotásico conteniendo ácido clorhídrico (HCl) 0,01 N, previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. La homegenización se realizó con ayuda de un homogeneizador eléctrico a un número bajo de revoluciones (300 rpm), con el fin de evitar el calentamiento de las muestras. Todo el procedimiento se realizó dentro de una cámara fría a una temperatura de 4°C y, tanto los homogeneizadores como las muestras, se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3200 g durante 20 minutos y a una temperatura de 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes, en los que se determinó el contenido de GT.

Para la determinación de los niveles intracelulares de GT en células inmunitarias, se ajustó la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank y se centrifugó a 1100 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 5% con HCl 0,01 N frío (que evita la auto-oxidación del glutatión, sensible a pH y temperatura), previamente burbujeado con helio durante 10 minutos. A continuación, las células se lisaron mediante sonicación en frío (3 ciclos de 10 segundos a una potencia

máxima del 75% con 20 segundos de reposo entre ciclos) y se añadieron 400 µL de solución TCA, manteniéndose la muestra en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3200 g y a 4°C, realizándose el ensayo en el sobrenadante.

La absorbancia se midió en espectofotómetro a una longitud de onda de 412 nm durante 4 minutos y cada 20 segundos, con 60 segundos de retardo inicial, dado que la forma reducida del DTNB (el 2-nitro-5-tiobenzoico o TNB) presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda. La reacción se realizó en presencia de DTNB 6 mM, NADPH 0,3 mM y GR 10 U/mL en tampón fosfato dipotásico 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4 previamente burbujeado con helio 10 minutos; soluciones hechas en el momento previo al ensayo. Paralelamente, se realizaron medidas de la reacción sin muestra, sustituyendo ésta por solución TCA, para evitar sobrevaloraciones del contenido de glutatión. Los valores de absorbancia de esta reacción carente de muestra se restaron como factor de corrección al valor de la absorbancia de la reacción con muestra. Para llevara a cabo el ensayo, se utilizaron microcubetas de vidrio óptico de 10 mm de paso óptico, conteniendo:

- Reacción con muestra: 500 µl NADPH 0,3 mM + 70 µl DTNB 6 mM + 70 µl muestra + 70 µl GR 10 U/mL. El blanco empleado estuvo constituido por 500 µl NADPH 0,3 mM + 70 µl DTNB 6 mM + 70 µl muestra + 70 µl solución de TCA.
- Reacción sin muestra: 500 µl NADPH 0,3 mM + 70 µl DTNB 6 mM + 70 µl solución de TCA + 70 µl GR 10 U/mL. En este caso el blanco utilizado se componía de 500 µl NADPH 0,3 mM + 70 µl DTNB 6 mM + 140 µl de solución de TCA.

Así mismo, se realizó una curva patrón, en las mismas condiciones que las muestras, a partir de una solución madre de TCA (21 mM) de la que se hicieron sucesivas diluciones en tampón fosfato dipotásico 50 mM con EDTA 6,3 mM pH 7,4 (desde 448 ng a 14 ng de GSH). Se obtuvieron rectas estándar representando en el eje de ordenadas la cantidad de GSH (ng) y en el eje de abscisas el incremento de la absorbancia por minuto final. La cantidad de GSH se calculó con la expresión que se detalla a continuación y los resultados fueron expresados como nmoles de GSH por mg de tejido (nmol GSH/mg tejido), en el caso de órganos, y como nmoles de GSH por 10<sup>6</sup> células (nmol GSH/10<sup>6</sup> células):

$$\text{ng GSH} = a \times \Delta\text{DO}/\text{min final} + b$$

$\text{nmol GSH/mg tejido} = [(\text{ng GSH} \times V_t \times \text{FD}) / (V_m \times 106 \times 0,30733)] \times (1/\text{Cp})$

Siendo:

Recta estándar:  $Y = a \cdot X + b$  ( $Y = \text{ng GSH}$ ;  $X = \Delta\text{DO}/\text{min final}$ ).

$\Delta\text{DO}/\text{min final}$ :  $\Delta\text{DO}/\text{min reacción con muestra} - \Delta\text{DO}/\text{min reacción sin muestra}$ .

a y b: coeficientes de la recta estándar.

$V_t$ : volumen total de la cubeta (0,71 ml).

### 3.3.8.7. Concentración de especies reactivas de oxígeno intracelulares

Los macrófagos son las principales células productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la suspensión peritoneal, aunque también las células NK y los linfocitos son capaces de ello, aunque en menor medida. La valoración de los niveles intracelulares de ROS en los leucocitos peritoneales se llevó a cabo mediante una técnica fluorimétrica previamente descrita y modificada ligeramente en nuestro laboratorio (Puerto *et al.*, 2002). Se empleó en ella el diacetato 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ), que es un compuesto no fluorescente y estable que atraviesa la membrana de la células debido a su carácter apolar. Una vez en el interior de la célula, éste es desacetilado, quedando atrapado en el citoplasma celular, donde es rápidamente oxidado en presencia de ROS, principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dando lugar a un compuesto altamente fluorescente: la 2'-7'-diclorofluoresceína.

El ensayo comienza ajustando la suspensión peritoneal a una concentración de  $1 \times 10^6$  leucocitos/mL en solución de Hank. A continuación, 200  $\mu\text{L}$  de dicha suspensión ajustada se dispensaron en una placa de 96 pocillos negra (NUNC), que se incubó durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y en oscuridad. Tras este tiempo, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de la sonda  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  10 mM (1 mM en el pocillo). La sonda se añadió a todos los pocillos a excepción de los destinados a la medición de la autofluorescencia de la muestra. La placa se incubó de nuevo, en similares condiciones a las anteriormente citadas, durante 15 minutos. Tras esta incubación, se dispensaron 20  $\mu\text{L}$  de los activadores, bien de PMA (50ng/mL, disuelto en DMSO y  $\text{H}_2\text{O}$  en proporción 1:4) bien de látex (solución al 10% en PBS), en los pocillos destinados a la medición de la producción de ROS en condiciones de estimulación.



Paralelamente, se añadieron 20  $\mu$ L de solución de Hank en los pocillos utilizados para la medida de producción espontánea o basal de ROS. Tras otros 15 minutos de incubación a 37°C y en oscuridad, se midió la cantidad de fluorescencia emitida por cada pocillo utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 535 nm.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje (%) de estimulación respecto del valor basal control (sin activadores), una vez sustraído el correspondiente valor de la autofluorescencia en todos los casos.

### 3.3.9. Estudio de la longevidad media

Los animales fueron mantenidos hasta su muerte natural. Las fechas de muerte fueron anotadas con el fin de determinar la longevidad de los ratones.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se utilizó el paquete estadístico SPSS 21.0. Todos los resultados se expresaron como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media de los datos obtenidos en cada prueba.

En el caso de las variables continuas, en primer lugar se comprobó si los datos se ajustaban a una distribución Normal mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*. Si éstos se ajustaban a dicha distribución, se procedió al análisis de la homogeneidad de las varianzas empleando el test de *Levene*. A continuación, las diferencias entre los distintos grupos experimentales se evaluaron mediante la “t” de *Student* para muestras independientes o dependientes (en el caso de las comparaciones antes, durante o después de una intervención entre individuos de un mismo grupo experimental). Por su parte, las diferencias entre variables categóricas se analizaron mediante el test de  $\chi^2$ . En el análisis de la longevidad, medida a través de la esperanza de vida media, se empleó el test de *Kaplan-Meier*. Además, en el subobjetivo “Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T”, la relación entre los valores del módulo elástico E y la longevidad media se determinó mediante el test de *Pearson*.

Se consideró que no existía significación si el valor de la probabilidad de significación (p) era mayor de 0,05. Una diferencia de

$p < 0,05$  se consideró como significativa, de  $p < 0,01$  como muy significativa y de  $p < 0,001$  como altamente significativa.



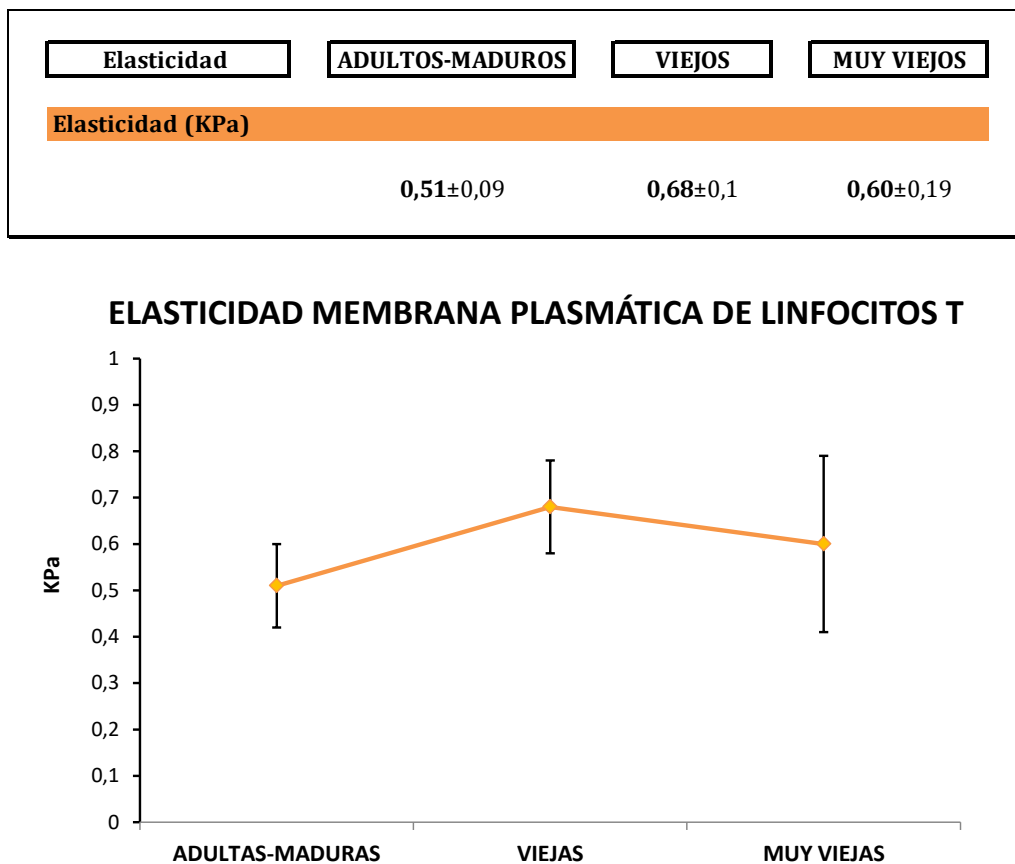
# Resultados



#### 4.1. PROFUNDIZACIÓN Y NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DE LA INMUNOSENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO EN RATONES.

##### 4.1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.

Los resultados del estudio de la variación de la elasticidad de la membrana plasmática de los linfocitos T peritoneales de ratones hembra ICR-CD1 en distintas edades a lo largo de su envejecimiento se muestran en la **Figura 28**.



**Figura 28.** Elasticidad (Módulo elástico, E) (KPa) de la membrana plasmática de linfocitos T peritoneales de ratones ICR-CD1 adultos-maduros (9-12±1 meses de edad), viejos (17-19±1 meses de edad) y muy viejos (21-23±1 meses de edad) evaluada mediante técnicas de aspiración con micropipeta. Cada punto representa la media ± error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de valores.

Como se puede observar en la **Figura XX1**, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al valor del **módulo elástico E**, esto es, en la elasticidad de las membranas plasmáticas de los linfocitos T a lo largo de la edad de los individuos del estudio.

También se valoró la posible relación entre los valores de elasticidad (modulo elástico E) de los linfocitos T de cada individuo en su edad adulta-madura con el momento en que éste falleció por causas naturales, no hallándose una relación clara entre ambos valores (Correlación de Pearson  $p=0,222$ ). Así, las variaciones en este parámetro evaluador de la elasticidad de las membranas de estas células inmunitarias no parecen relacionarse con la **longevidad media**.

### 4.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.

Las concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10 e IL17 tanto secretadas por los leucocitos peritoneales como las contenidas en el interior de dichas células inmunitarias en condiciones de cultivo sin estimulación (basal) o de estimulación (en presencia de los mitógenos LPS y ConA) a lo largo de la vida de ratones hembra ICR-CD1 se recogen en la **Tabla 3** y en las **Figuras 29 y 30**.

Atendiendo a las concentraciones de la citoquina pro-inflamatoria **IL1 $\beta$  secretados** por los leucocitos en cultivo (**Tabla 3**) en condiciones de reposo o estado **basal**, se observa un aumento continuo de las mismas al avanzar la edad, alcanzando estas diferencias la significación estadística a los 20 meses con respecto a la edad adulta ( $p<0,001$ ). Así mismo, también se observa una mayor liberación de IL1 $\beta$  por parte de los leucocitos de los ratones maduros (13 meses) y viejos (20 meses) en comparación con la mostrada a los 2 meses de edad ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente). En relación a las concentraciones de esta citoquina pro-inflamatoria en condiciones de **estimulación** (**Tabla 3**), en general se observa un aumento de las mismas desde los 2 meses de edad hasta los 13 meses (edad madura), que luego descienden significativamente en la vejez (20 meses) en comparación con la edad adulta (9 meses). Así, se obtuvieron menores cantidades de IL1 $\beta$  en los sobrenadantes de los cultivos de leucocitos en presencia de **LPS** a los 20 meses con respecto a la edad adulta ( $p<0,001$ ). En presencia de **ConA**, los leucocitos liberaron mayores niveles de dicha citoquina en la edad madura con respecto a los 2 meses de edad ( $p<0,001$ ) y en la vejez en relación con los 2 meses ( $p<0,01$ ). En esta última edad (20 meses), la concentración de IL1 $\beta$  secretada en presencia de ConA es menor en relación a los 9 meses de edad ( $p<0,05$ ). Por su parte, las concentraciones **intracelulares** de **IL1 $\beta$**  en los leucocitos peritoneales (**Tabla 3**) experimentan un descenso gradual al avanzar la edad en estado **basal**, de manera que

las menores concentraciones de esta citoquina se alcanzan en la edad madura (13 meses) y en la vejez (20 meses) con respecto a los 2 meses ( $p < 0,05$  en ambos casos), si bien no se obtuvieron diferencias significativas en comparación con las encontradas en la edad adulta. Por el contrario, cuando los leucocitos se cultivaron en presencia de **estímulos** (los mitógenos LPS y ConA), su contenido en IL1 $\beta$  aumentó paulatinamente con el envejecimiento, llegando a sus niveles máximos en la edad adulta para luego ir reduciéndose hasta la vejez. Así se observa que, a los 20 meses, los leucocitos peritoneales cultivados en presencia de LPS y ConA mostraron menores concentraciones intracelulares de esta citoquina con respecto a la edad adulta, alcanzando esta diferencia la significación estadística en el caso de la ConA ( $p < 0,05$ ). Además, a los 2 meses de edad las cantidades intracelulares de esta citoquina generados en condiciones de estimulación fueron mínimas, mostrándose significativamente menores con respecto a la edad adulta ( $p < 0,05$  para LPS y ConA) y a la edad madura ( $p < 0,01$  para el LPS y  $p < 0,05$  para la ConA) e, incluso en relación a la vejez ( $p < 0,05$  para ambos mitógenos).

En relación a las concentraciones de **TNF $\alpha$**  (**Tabla 3**), las correspondientes a la citoquina **secretada**, disminuyeron en la vejez (20 meses) en presencia de los dos mitógenos utilizados. En el caso de los cultivos a los que se adicionó **LPS**, esta disminución fue significativa con respecto a la edad adulta ( $p < 0,01$ ) y los 2 meses ( $p < 0,01$ ). En presencia de **ConA** los leucocitos de ratones de 20 meses también liberaron menores cantidades de esta citoquina en comparación con la edad adulta ( $p < 0,05$ ). No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a las cantidades de TNF $\alpha$  secretadas en condiciones **basales** entre las diferentes edades de estudio, si bien cabe destacar un ligero aumento de la secreción de esta citoquina en la vejez (20 meses) con respecto a la edad adulta (9 meses). Por su parte, las concentraciones **intracelulares** de TNF $\alpha$  obtenidas en condiciones **basales** (**Tabla 3**) fueron similares en cada una de las edades estudiadas, destacando la existencia de un pico de dichos niveles a los 4 meses en comparación con la edad adulta y los 2 meses de edad ( $p < 0,05$  en ambos casos). En el caso de las cantidades intracelulares de esta citoquina pro-inflamatoria en presencia de los mitógenos **LPS y ConA**, se observa en general un aumento de los mismos al avanzar la edad hasta la edad madura disminuyendo en la vejez, de forma que a los 20 meses el contenido intracelular de TNF $\alpha$  es notablemente menor en estas condiciones de estimulación, con respecto a los 2 meses en el caso del



## Resultados

**Tabla 3. Concentraciones de citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10 e IL17 secretadas por los leucocitos peritoneales en cultivo o contenidas en el interior de dichas células en condiciones de reposo (basal) y en presencia de los mitógenos LPS y ConA, de ratones ICR-CD1 a los 2, 4, 9, 13 y 20 meses de edad (jóvenes, adultos jóvenes, adultos, maduros y viejos respectivamente).**

Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos en cultivo	2 meses	4 meses	9 meses	13 meses	20 meses
<b>IL1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	Basal 11 $\pm$ 4 LPS 152 $\pm$ 39 ConA 16 $\pm$ 4 **	17 $\pm$ 6 76 $\pm$ 24 * 181 $\pm$ 35 * •••	27 $\pm$ 3 215 $\pm$ 20 80 $\pm$ 10	46 $\pm$ 6 •• 184 $\pm$ 42 83 $\pm$ 9 •••	73 $\pm$ 7 ***• 74 $\pm$ 5 *** 42 $\pm$ 4 * ••
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	Basal 41 $\pm$ 16 LPS 186 $\pm$ 30 ConA 75 $\pm$ 14	29 $\pm$ 10 114 $\pm$ 12 111 $\pm$ 13	16 $\pm$ 3 106 $\pm$ 20 80 $\pm$ 5	18 $\pm$ 4 106 $\pm$ 22 54 $\pm$ 7	41 $\pm$ 8 58 $\pm$ 5 ***• 51 $\pm$ 4 *
<b>IL6 (pg/mL)</b>	Basal 2843 $\pm$ 374 LPS 8413 $\pm$ 621 * ConA 3244 $\pm$ 75 ***	1558 $\pm$ 158 • 12253 $\pm$ 880 •• 13276 $\pm$ 2025 ••	1722 $\pm$ 449 11916 $\pm$ 423 11395 $\pm$ 670	1077 $\pm$ 206 •• 5298 $\pm$ 174 ***••• 3260 $\pm$ 295 ***	3622 $\pm$ 202 *** 4500 $\pm$ 329 ***•• 3300 $\pm$ 214 ***
<b>IL10 (pg/mL)</b>	Basal 204 $\pm$ 34 LPS 1130 $\pm$ 153 ConA 652 $\pm$ 73	193 $\pm$ 27 1278 $\pm$ 10 590 $\pm$ 72	210 $\pm$ 17 1205 $\pm$ 74 488 $\pm$ 31	192 $\pm$ 16 728 $\pm$ 60 • 260 $\pm$ 35 ***••	122 $\pm$ 25 ** 330 $\pm$ 80 ***•• 234 $\pm$ 37 ***••
<b>IL17 (pg/mL)</b>	Basal 3 $\pm$ 1 *** LPS 6 $\pm$ 3 *** ConA 17 $\pm$ 3 ***	25 $\pm$ 5 •• 27 $\pm$ 6 • 28 $\pm$ 7	31 $\pm$ 8 56 $\pm$ 11 41 $\pm$ 13	28 $\pm$ 8 • 40 $\pm$ 5 ••• 75 $\pm$ 11 ••	19 $\pm$ 2 ••• 37 $\pm$ 9 • 93 $\pm$ 10 •••
Concentraciones de citoquinas intracelulares de leucocitos en cultivo	2 meses	4 meses	9 meses	13 meses	20 meses
<b>IL1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	Basal 4 $\pm$ 1 LPS 6 $\pm$ 0,5 * ConA 5 $\pm$ 2 *	3 $\pm$ 1 11 $\pm$ 0,5 ••• 17 $\pm$ 12	2 $\pm$ 0,5 16 $\pm$ 2 20 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0,5 • 15 $\pm$ 2 •• 13 $\pm$ 3 •	1 $\pm$ 0,5 • 8 $\pm$ 0,5 • 10 $\pm$ 1 *•
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	Basal 2 $\pm$ 0,5 LPS 4 $\pm$ 0,5 ConA 4 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 0,5 *• 5 $\pm$ 0,5 3 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,5 4 $\pm$ 2 10 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0,5 7 $\pm$ 1 • 10 $\pm$ 0,5 •••	2 $\pm$ 0,5 2 $\pm$ 0,5 • 2 $\pm$ 0,5 *•
<b>IL6 (pg/mL)</b>	Basal 221 $\pm$ 52 *** LPS 745 $\pm$ 148 *** ConA 402 $\pm$ 13 **	69 $\pm$ 17 • 511 $\pm$ 65 ** 279 $\pm$ 43 •	29 $\pm$ 12 150 $\pm$ 25 200 $\pm$ 52	33 $\pm$ 5 • 294 $\pm$ 26 *• 294 $\pm$ 26 *••	132 $\pm$ 16 ** 235 $\pm$ 74 • 209 $\pm$ 15 •••
<b>IL10 (pg/mL)</b>	Basal 4 $\pm$ 2 LPS 8 $\pm$ 0,5 ConA 7 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0,5 5 $\pm$ 0,5 •• 1 $\pm$ 0,5 ••	3 $\pm$ 0,5 6 $\pm$ 0,5 3 $\pm$ 0,5 •	3 $\pm$ 0,5 5 $\pm$ 1 • 3 $\pm$ 0,5 •	7 $\pm$ 0,5 * 1 $\pm$ 0,5 ***••• 1 $\pm$ 0,5 ••

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 4 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor obtenido a los 9 meses de edad. ••p<0,001, •p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor a los 2 meses de edad. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: Tumor Necrosis Factor o Factor de Necrosis Tumoral.

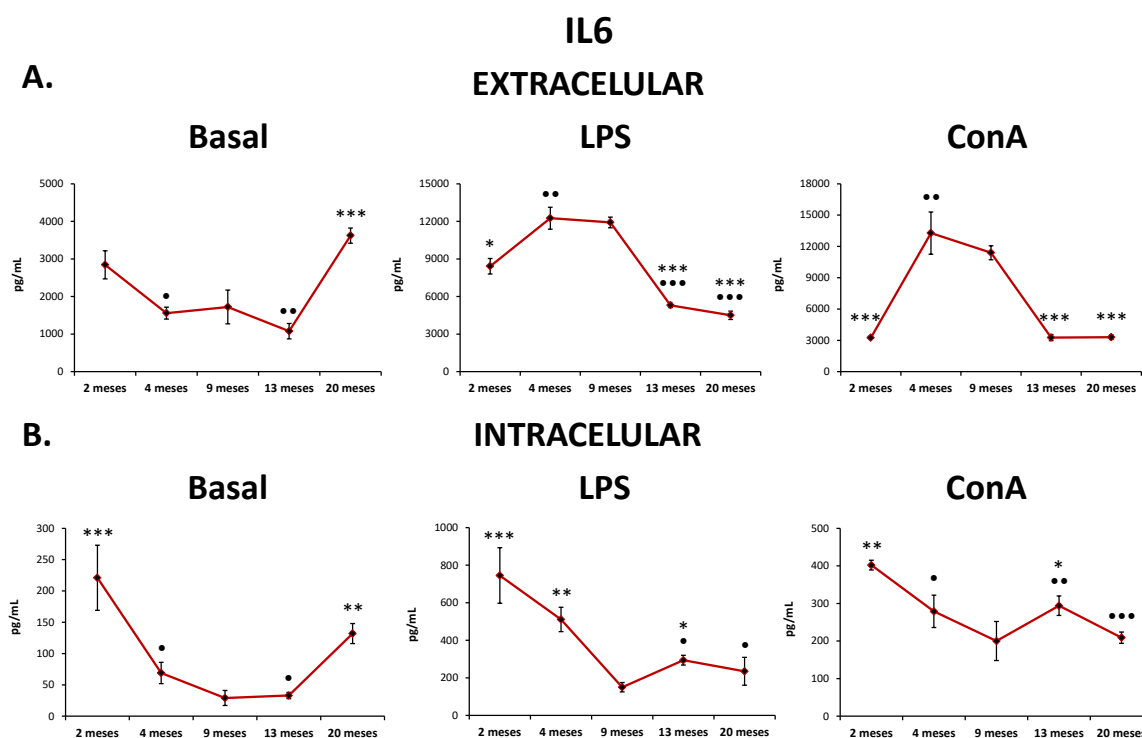
LPS ( $p<0,05$ ) y en comparación con la edad adulta y los 2 meses ( $p<0,05$  en ambos casos) en presencia de ConA.

Atendiendo a la **IL6 (Tabla 3, Fig. 29A)**, las concentraciones **secretadas** por los leucocitos, en condiciones **basales** mostraron un descenso de los mismos desde los 2 meses de edad hasta los 13 meses, dándose un aumento significativo en la vejez, de manera que a los 20 meses los leucocitos liberan una mayor cantidad de IL6 con respecto a la edad adulta ( $p<0,001$ ). En presencia de **estímulos** (los mitógenos LPS y ConA), se produjo un descenso de esta citoquina pro-inflamatoria desde los 13 meses y en la vejez. Así, a la edad madura (13 meses) las concentraciones disminuyeron con respecto a la edad adulta ( $p<0,001$  tanto en el caso del LPS como de la ConA) y alcanzando los valores menores a los 20 meses ( $p<0,001$  para ambos estímulos) en relación a los 9 meses. Cabe destacar que las cantidades secretadas de IL6 obtenidas a los 2 meses de edad se asemejan a las determinadas en la vejez, salvo en el caso de la liberación en presencia de LPS en el que los individuos viejos secretaron menos cantidad de esta citoquina en comparación con los 2 meses ( $p<0,01$ ). Así, los leucocitos de los individuos jóvenes secretan menores cantidades de IL6 en presencia de LPS ( $p<0,05$ ) y ConA ( $p<0,001$ ) con respecto a la edad adulta. En referencia a las concentraciones **intracelulares de IL6 (Tabla 3, Fig. 29B)**, se observa un descenso de las mismos desde los 2 meses de edad en condiciones **basales**, pero hay un aumento a los 20 meses, con diferencias frente a la edad adulta ( $p<0,01$ ). En los niveles intracelulares en presencia de estímulos, **LPS y ConA**, se dio una disminución con la edad. Así, a los 2 meses se observa que los niveles intracelulares de IL6 se encuentran elevados especialmente en relación a la edad adulta ( $p<0,001$  en presencia de LPS y  $p<0,01$  en el caso de la ConA). En comparación con esta edad adulta, se produjo un aumento en la madura (13 meses) ( $p<0,05$  para ambos estímulos).

En referencia a las concentraciones de la citoquina anti-inflamatoria **IL10 (Tabla 3, Fig. 30A) secretadas** por los leucocitos peritoneales en estado **basal**, se observa que éstos se mantienen estables al avanzar la edad, descendiendo drásticamente en la vejez con respecto a la edad adulta ( $p<0,01$ ). En relación a los secretados en presencia de los mitógenos **LPS y ConA**, fueron menores ya en la edad madura, con respecto a los 2 meses de edad para ambos estímulos ( $p<0,05$  para el LPS y  $p<0,01$  para la ConA) y con los 9 meses en el caso de la ConA ( $p<0,01$ ). Este descenso de esta citoquina anti-inflamatoria se acentúa en la vejez, de manera que los animales de 20 meses presentaron las menores cantidades secretadas de IL10 en presencia

## Resultados

de LPS y ConA, en comparación con la edad adulta ( $p < 0,001$  para el LPS y  $p < 0,01$  para la ConA) y con los 2 meses de edad ( $p < 0,01$  en presencia de ambos estímulos). En relación a las concentraciones **intracelulares** de IL10 (Tabla 3 y Fig. 30B), en la vejez se observa un notable aumento de los mismos en estado **basal** ( $p < 0,05$ ) en comparación con la edad adulta. En presencia de **LPS**, por el contrario tuvo lugar una disminución ( $p < 0,01$ ). Cabe destacar que a los 2 meses de edad, los leucocitos peritoneales contenían mayores cantidades de IL10 en comparación con el resto de edades, en general.

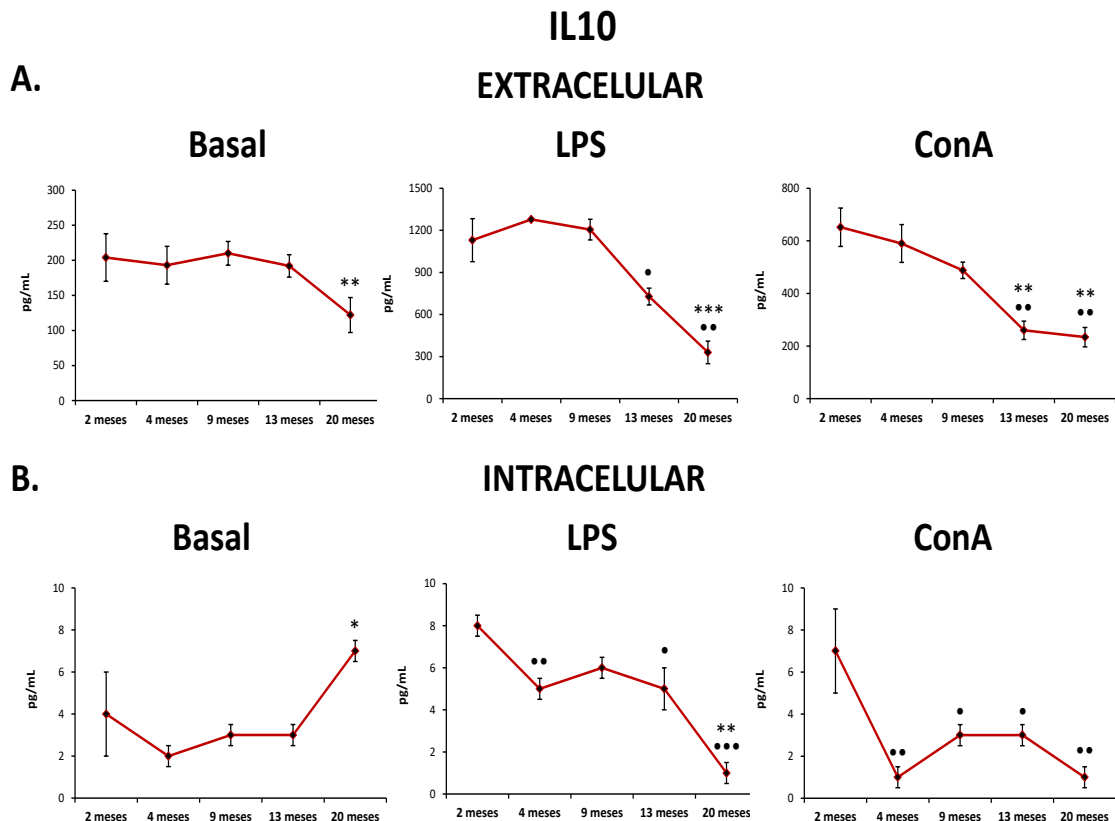


**Figura 29. Concentraciones (pg/mL) de IL6 secretados (A) e intracelulares (B) en leucocitos peritoneales en condiciones de no estimulación (basal) o en presencia de los estímulos LPS y ConA de ratones ICR-CD1 de 2, 4, 9, 13 y 20 meses de edad (jóvenes, adultos jóvenes, adultos y viejos respectivamente).** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en la edad adulta (9 meses). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor a los 2 meses de edad. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina.

Finalmente, en cuanto a la **IL17** secretada por los leucocitos peritoneales en cultivo (Tabla 3), se observa que en condiciones **basales** dichos niveles permanecen estables desde los 4 meses, momento en el que experimentan un aumento frente a los valores en los 2 meses de edad. En referencia a las cantidades de esta citoquina liberadas en presencia del **LPS**, se observa un aumento de las mismas desde los 4 meses de edad, alcanzando un pico a los 9 meses y descendiendo en la edad madura y en los 20 meses. Por su parte, los

## Resultados

leucocitos cultivados en presencia de **ConA** liberaron cada vez mayores cantidades de IL17 a partir de los 4 meses, alcanzando éstos un pico a los 20 meses de edad. Además también se observa que a los 2 meses se secretan los valores más bajos de esta citoquina en presencia de LPS y ConA con respecto al resto de edades valoradas.



**Figura 30. Concentraciones (pg/mL) de IL10 secretados (A) e intracelulares (B) en leucocitos peritoneales en condiciones de no estimulación (basal) o en presencia de los estímulos LPS y ConA de ratones ICR-CD1 de 2, 4, 9, 13 y 20 meses de edad (jóvenes, adultos jóvenes, adultos y viejos respectivamente). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en la edad adulta (9 meses). ••• $p < 0,001$ , •• $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor a los 2 meses de edad. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina.**

## 4.2. PROFUNDIZACIÓN EN PARÁMETROS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN RATONES PREMATURAMENTE ENVEJECIDOS (PAM).

Los resultados acerca de la actividad física voluntaria y la conducta de ansiedad así como sobre los niveles de algunas citoquinas secretadas por los leucocitos en cultivo en los PAM, se recogen en las **Tablas 4 a 7** y en las **Figuras 31 a 34**, que se muestran a continuación.

### 4.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.

#### 4.2.1.1. Actividad física voluntaria

Para evaluar la actividad física voluntaria de los PAM, se utilizó una rueda de actividad adherida a las paredes de la jaula y acoplada a un sensor magnético.

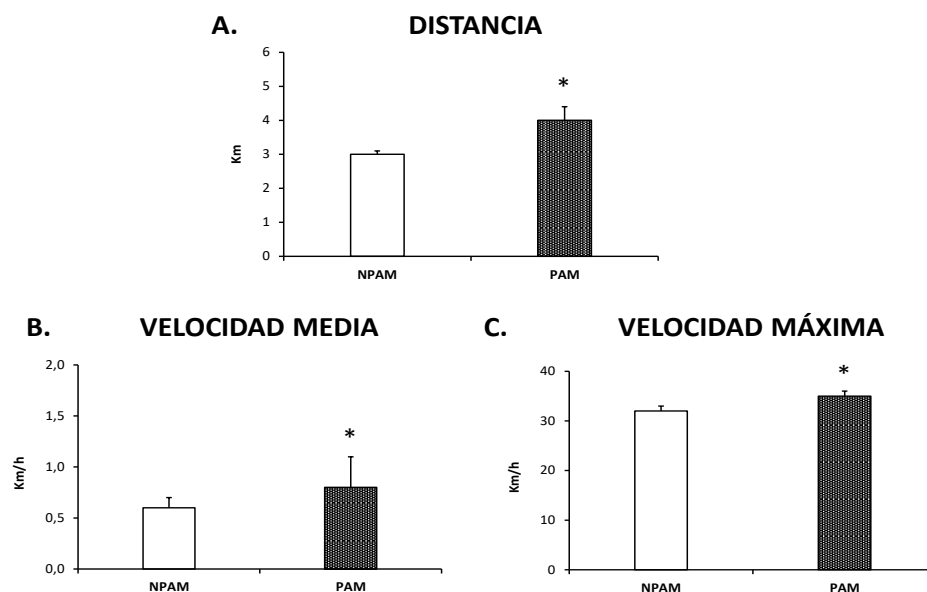
**Tabla 4.** Actividad física voluntaria en la rueda de PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad).

Actividad voluntaria en la rueda	NPAM	PAM
Distancia recorrida diaria (km)	3±0,1	4±0,4 *
Tiempo empleado diario (h)	4±0,4	5±0,3
Velocidad media diaria (km/h)	0,6±0,1	0,8±0,3 *
Velocidad máxima diaria (km/h)	32±1	35±1 *

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales. \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente; NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

Como se observa en la **tabla 4**, los PAM recorrieron una mayor **distancia** y alcanzaron mayores **velocidades media y máxima** con respecto a los NPAM (p<0,05 en todos los casos) (**Fig. 31**).

### ACTIVIDAD FÍSICA VOLUNTARIA



**Figura 31. Distancia recorrida (km) (A), velocidad media (km/h) (B) y velocidad máxima (km/h) (C) diarias realizadas por PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad).** Cada barra representa la media ± error estándar de 8 valores correspondientes a ese mismo número de animales. \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

#### 4.2.1.2. Conducta de ansiedad

Con el fin de profundizar en la conducta de ansiedad en los PAM, se realizó un estudio de las conductas de anidación y de enterramiento presentadas por estos ratones y se compararon con las de NPAM. Los resultados se muestran a continuación.

##### a) Conducta de anidación

Los resultados referidos en la **Tabla 5**, muestran que los PAM no lograron construir un nido perfecto (puntuación de 5 en la escala de Deacon) a lo largo de las 72 h de duración de la prueba, mientras que los NPAM sí que alcanzaron la puntuación máxima a las 72 h ( $p < 0,05$ , con respecto al valor de las 24 h). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales atendiendo a la estructura de su nido.

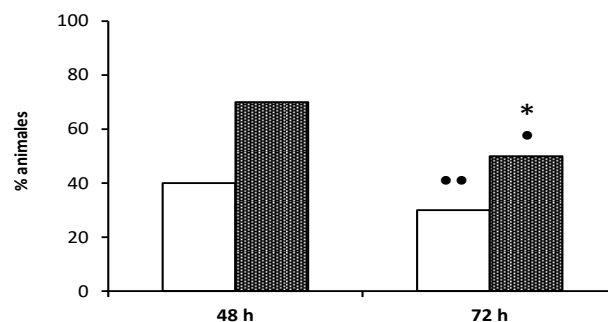
Tabla 5. Conducta de anidación de PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad)

Conducta de anidación	NPAM	PAM
<b>Puntuación del nido según la escala de Deacon</b>		
24 h	4±0,2	4±0,2
48 h	4±0,4	4±0,3
72 h	5±0,2 •	4±1
<b>Capacidad de perfeccionamiento (% animales)</b>		
48 h (vs. 24 h)	40	30
72 h (vs. 24 h)	70 ••	50 * •

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. ••p<0,01, •p<0,05 con respecto al correspondiente valor a las 24 horas. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

Con respecto a la “capacidad de perfeccionamiento” (que indica que el animal es capaz de mejorar su nido en un punto con respecto a la puntuación recogida a las 24 h), se observa que un mayor porcentaje tanto de PAM como de NPAM fue capaz de mejorar la estructura de su nido a las 72 h con respecto al correspondiente nido observado a las 24 h (p<0,05 y p<0,01, respectivamente). Sin embargo, una menor proporción de PAM que de NPAM lograron perfeccionar su nido a las 72 h (p<0,05) (**Fig. 32**)

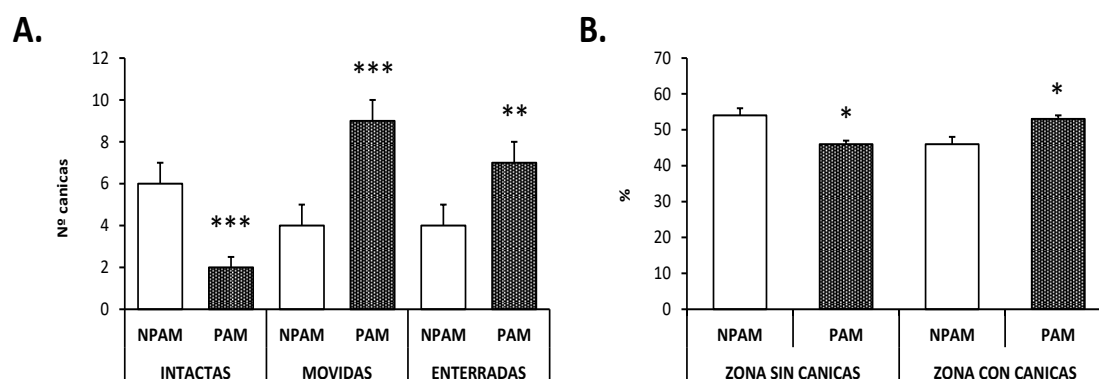
### CAPACIDAD DE PERFECCIONAMIENTO



**Figura 32. Capacidad de perfeccionamiento del nido en la conducta de anidación de PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad).** Cada barra representa la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. ••p<0,01, •p<0,05 con respecto al correspondiente valor a las 24 horas. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

## b) Conducta de enterramiento

Para abordar el estudio de la conducta de enterramiento en los PAM (y NPAM), los animales se sometieron a la prueba conductual denominada “prueba de las canicas” realizada en dos condiciones: la condición “estándar”, con las canicas distribuidas homogéneamente por el lecho de la caja, y la condición “bizonal”, con las canicas ubicadas únicamente en una de las mitades del lecho. Los resultados se recogen en la **Tabla 6 (A y B)** y en la **Figura 33 (A y B)**.



**Figura 33.** Conducta de enterramiento en la “prueba de las canicas” de PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad). Número de canicas intactas, movidas o enterradas en la condición “estándar” (A) y tiempo (%) permanecido en las zonas sin o con canicas en la condición “bizonal” (B). Cada barra representa la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

Como se puede observar en la **tabla 6A**, en la **condición “estándar”** los PAM movieron y enterraron más canicas y dejaron intactas menos piezas con respecto a los NPAM (**Fig. 33A**;  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente). Además, los PAM realizaron una conducta similar en la **condición “bizonal”** (**Tabla 33B**), moviendo y enterrando un mayor número de canicas y dejando intactas una menor cantidad ( $p < 0,01$  en todos los casos), con respecto a los NPAM. Así mismo, los PAM permanecieron más tiempo en la zona con piezas y menos tiempo en la zona carente de ellas, en comparación con los NPAM ( $p < 0,05$  en ambos casos) (**Fig. 33B**).



## Resultados

**Tabla 6. Conducta de enterramiento observada en la “prueba de las canicas” realizada en condiciones “estándar” (A) y “bizonal” (B) de individuos PAM y NPAM adultos (9±1 meses de edad).**

A

Prueba de las canicas			
Condición estándar			
	Nº canicas intactas	Nº canicas movidas	Nº canicas enterradas
NPAM	6±1	4±1	4±1
PAM	2±0,5 ***	9±1***	7±1 **

B

Prueba de las canicas					
Condición bizonal					
	Tiempo en la zona sin piezas (%)	Tiempo en la zona con piezas (%)	Nº canicas intactas	Nº canicas movidas	Nº canicas enterradas
NPAM	54±2	46±2	4±1	4±1	4±1
PAM	47±1 *	53±1 *	1±0,5 **	7±0,5 **	6±1 **

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente.

### 4.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.

Los datos relativos a las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6, de la citoquina anti-inflamatoria IL10 y de las citoquinas IL2 e IL17 secretadas al medio de cultivo por los leucocitos peritoneales de PAM y NPAM a las 48 h en ausencia (basal) o presencia de los mitógenos LPS y ConA, se recogen en la **Tabla 7** y la **Figura 34**.

Con respecto a las **citoquinas pro-inflamatorias** valoradas (**Tabla 7**) se observa que, en estado **basal**, los leucocitos de PAM secretaron al medio de cultivo mayores cantidades de IL1 $\beta$  (**Fig. 34**) y TNF $\alpha$  en relación a los NPAM ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). Así mismo, los PAM muestran mayor liberación de IL6 en estado de reposo, si bien la diferencia no es significativamente estadística. Atendiendo a las cantidades de estas citoquinas en presencia del mitógeno **LPS**, los leucocitos de PAM liberaron menos cantidad de IL1 $\beta$

## Resultados

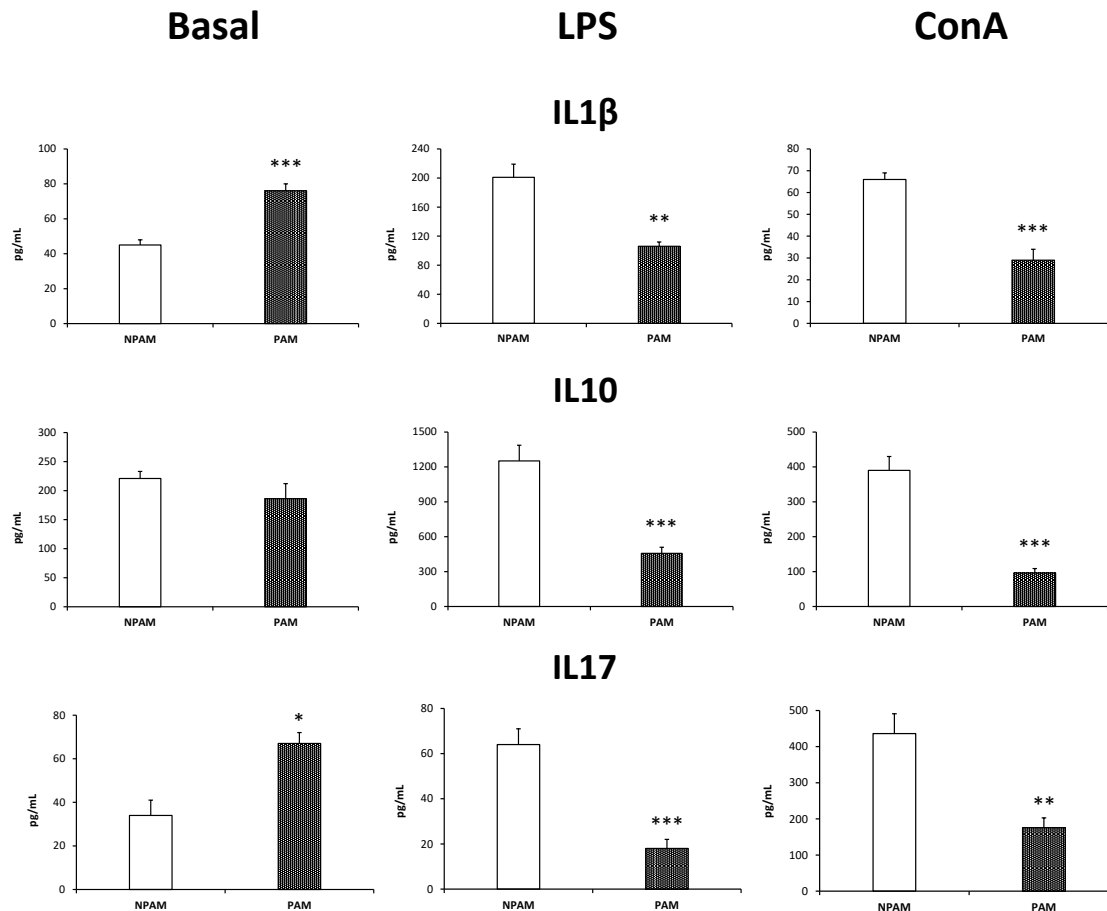
(Fig. 34) y de IL6 que los de NPAM ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente), no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio en el caso del TNF $\alpha$ .

Tabla 7. Concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6, de la citoquina anti-inflamatoria IL10 y de las citoquinas IL2 e IL17 secretadas por los leucocitos peritoneales de PAM y NPAM adultos (9 $\pm$ 1 meses de edad) en cultivo en condiciones de reposo (basal) o en presencia de los mitógenos LPS y ConA.

Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos en cultivo	NPAM	PAM
<b>IL1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>		
Basal	45 $\pm$ 3	76 $\pm$ 4 ***
LPS	201 $\pm$ 18	106 $\pm$ 6 **
ConA	66 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5 ***
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>		
Basal	25 $\pm$ 2	53 $\pm$ 5 **
LPS	103 $\pm$ 8	126 $\pm$ 8
ConA	95 $\pm$ 13	58 $\pm$ 3
<b>IL6 (pg/mL)</b>		
Basal	362 $\pm$ 24	506 $\pm$ 46
LPS	1461 $\pm$ 179	814 $\pm$ 40 *
ConA	1161 $\pm$ 72	591 $\pm$ 37 ***
<b>IL10 (pg/mL)</b>		
Basal	221 $\pm$ 12	186 $\pm$ 26
LPS	1252 $\pm$ 135	457 $\pm$ 53 ***
ConA	390 $\pm$ 40	96 $\pm$ 13 ***
<b>IL2 (pg/mL)</b>		
ConA	98 $\pm$ 11	44 $\pm$ 2 **
<b>IL17 (pg/mL)</b>		
Basal	34 $\pm$ 7	67 $\pm$ 5 *
LPS	64 $\pm$ 7	18 $\pm$ 4 ***
ConA	436 $\pm$ 55	176 $\pm$ 27 **

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ , \* $p<0,05$  con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

En cuanto a la secreción de dichas citoquinas proinflamatorias en presencia del mitógeno **ConA**, de forma similar a lo observado con el LPS, se detectaron cantidades menores de IL1 $\beta$  (Fig. 34) y de IL6 en los sobrenadantes de los leucocitos de PAM, en relación de NPAM ( $p<0,001$ , en ambos casos). Si bien estas concentraciones menores también se observaron en el caso del TNF $\alpha$ , las diferencias no alcanzaron significación estadística.



**Figura 34.** Concentraciones (pg/mL) de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM y NPAM adultos (9 $\pm$ 1 meses de edad) en cultivo en condiciones de reposo (basal) y en presencia de LPS y ConA. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor obtenido en los NPAM. PAM: *Prematurely aging mice* o ratones envejecidos prematuramente, NPAM: *Non prematurely aging mice* o ratones no envejecidos prematuramente, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

Atendiendo a las concentraciones de la **citoquina anti-inflamatoria IL10**, los PAM secretaron menos cantidades de este mediador en presencia de los mitógenos **LPS y ConA** (p<0,001, en ambos casos), sin obtenerse diferencias estadísticas en este parámetro en condiciones **basales** (Tabla 7 y Fig. 34).

Con respecto a los resultados de la **IL17** (Tabla 7 y en la Fig. 34), se observan unas concentraciones mayores de esta citoquina en condiciones **basales** en los PAM con respecto a los NPAM (p<0,05). Por el contrario, los leucocitos de los PAM secretaron cantidades menores de IL17 en presencia de los mitógenos **LPS y ConA** que los de los NPAM (p<0,001 y p<0,01, respectivamente). Finalmente, los leucocitos de los PAM liberaron menos cantidad de **IL2** al medio de cultivo que los de los NPAM (p<0,01) en presencia de **ConA** (Tabla 7). Las

concentraciones de IL2 en condiciones basales y en presencia de LPS no se muestran debido a que fueron inferiores al límite mínimo de detección del kit comercial empleado.

#### 4.3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL Y DE LA ANSIEDAD EN MODELOS MURINOS A DIFERENTES EDADES.

##### 4.3.1. Efecto de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos de un protocolo de separación materna realizado durante el periodo de lactancia sobre la funcionalidad de leucocitos esplénicos y tímicos en ratas adultas machos y hembra se recogen en la **Tabla 8** y en la **Figura 35**.

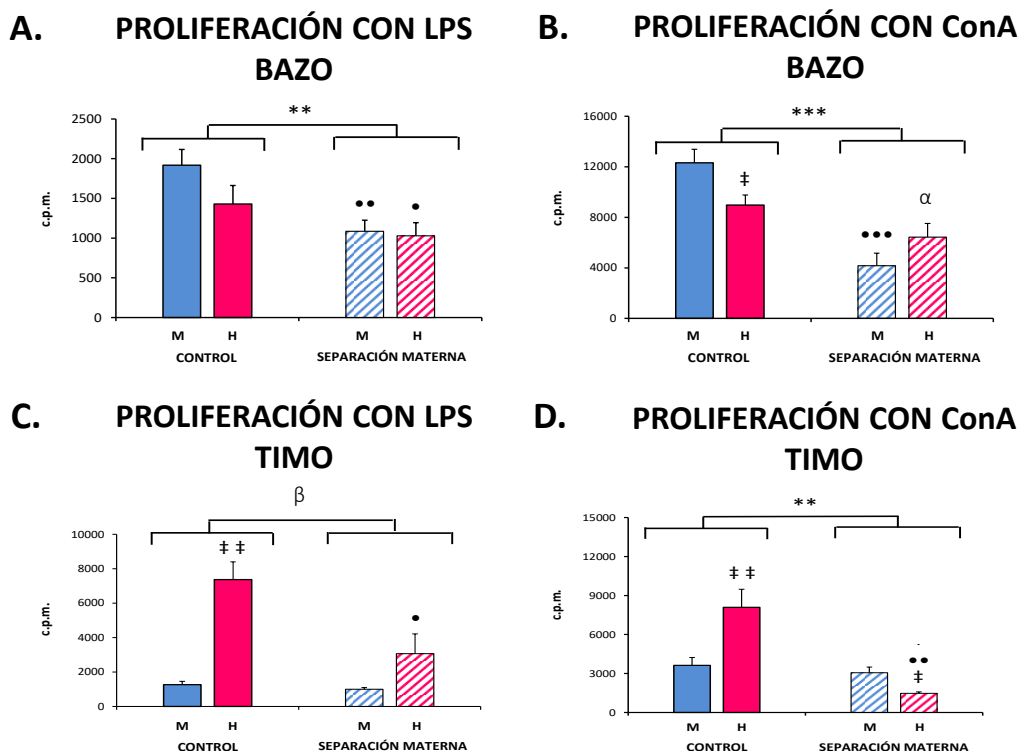
**Tabla 8. Funciones inmunitarias de leucocitos esplénicos y tímicos en ratas macho y hembra adultos (60-75 días de edad) sometidos a un protocolo de separación materna durante la lactancia (SM) o no (C).**

	Leucocitos esplénicos		Leucocitos tímicos	
	C	SM	C	SM
<b>Índice de Quimiotaxis (nº leucocitos)</b>				
Población total	2798±303	2834±238	2959±113	2732±151
Machos	2569±485	2874±358	2994±140	2646±257
Hembras	3059±354	2794±336	2924±187	2818±173
<b>Actividad NK (% lisis)</b>				
Población total	38±2,29	37±2,38	37±1,28	36±1,77
Machos	32±3,59	34±4,01	38±2,67	36±3,50
Hembras	43±1,25 ‡	40±2,44	36±1,15	37±1,88
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>				
<b>En respuesta a LPS</b>				
Población total	1639±166	1053±109 **	4317±1048	2033±644 β
Machos	1918±198	1086±140 ••	1264±194	1001±97
Hembras	1429±233	1028±166 •	7370±1031 ‡‡	3065±1151 •
<b>En respuesta a ConA</b>				
Población total	10255±774	5463±789 ***	5539±899	2399±344 **
Machos	12316±1072	4169±996 •••	3623±611	3059±439
Hembras	8966±802 ‡	6434±1085 α	8095±1386 ‡‡	1476±110 •• ‡

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (actividad NK y proliferación). \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, β 0,05>p<0,1 representan las diferencias entre SM y C, sin tener en cuenta el sexo. •••p<0,001, ••p<0,01, •p<0,05, α 0,05>p<0,1 con respecto al correspondiente valor en C del mismo sexo. ‡‡p<0,01, ‡p<0,05 con respecto al correspondiente valor en machos. ‡: tendencia estadística, C: animales control, SM: animales sometidos al protocolo de separación materna, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

## Resultados

Como se observa en la **Tabla 8**, no se obtuvieron diferencias significativas en la **quimiotaxis** y en la **actividad citotóxica NK** entre los animales control (C) y los sometidos a separación materna (SM), ni en el caso de los leucocitos esplénicos ni en de los tímicos. En relación con los resultados obtenidos en la **respuesta proliferativa** en presencia del **LPS** en bazo (**Fig. 35A**) y timo (**Fig. 35C**), se aprecia que ésta fue menor en las ratas con SM en comparación con las C, siendo significativa, para la población total, en el caso de los leucocitos de bazo ( $p<0,01$ ) y quedándose en tendencia estadística en los leucocitos tímicos ( $0,05>p<0,1$ ).



**Figura 35. Proliferación (cpm) en respuesta a LPS y ConA de leucocitos de bazo (A y B) y timo (C y D) en ratas macho y hembra adultos (60-75 días de edad) sometidos a un protocolo de separación materna durante la lactancia (SM) o no (C).** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ ,  $\beta$   $0,05>p<0,1$  representan las diferencias entre SM y C, sin tener en cuenta el sexo. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$ , • $p<0,05$ ,  $\alpha$   $0,05>p<0,1$  con respecto al correspondiente valor en C del mismo sexo. †† $p<0,01$ , † $p<0,05$  con respecto al correspondiente valor en machos. A: tendencia estadística, M: machos, H: hembras, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, c.p.m.: cuentas por minuto.

Así mismo, considerando cada uno de los sexos, los leucocitos esplénicos tanto de machos como de hembras SM proliferaron menos en presencia de este mitógeno en relación a sus correspondientes controles de igual sexo ( $p<0,01$  para los machos y  $p<0,05$  para las hembras), mientras que sólo los leucocitos tímicos de las hembras SM

mostraron una menor proliferación en presencia de LPS con respecto al valor correspondiente obtenido en las hembras C ( $p < 0,05$ ). De forma similar, los leucocitos esplénicos y tímicos de los animales SM proliferaron menos en respuesta a la **ConA** (**Fig. 35B** y **Fig. 35D**) en relación a los individuos C ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). Tanto los machos como las hembras SM mostraron una menor capacidad proliferativa en respuesta a este mitógeno en el bazo ( $p < 0,001$ , para los machos, y  $0,05 > p < 0,1$ , para las hembras) mientras que únicamente los leucocitos tímicos de las hembras SM proliferaron significativamente menos ( $p < 0,01$ ) con respecto a los de las hembras C.

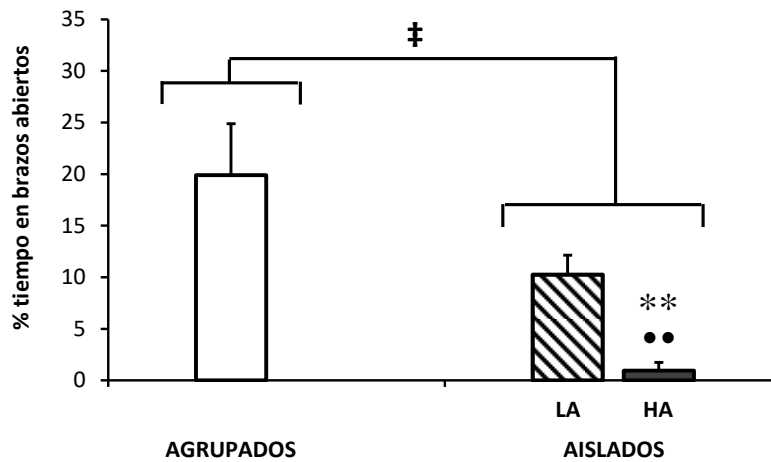
Teniendo en cuenta las **diferencias** entre ambos **sexos**, se observa que los leucocitos tímicos de las hembras C proliferaron más que los de los machos tanto en presencia de LPS como de ConA ( $p < 0,01$ ). Con respecto a los leucocitos esplénicos, las hembras control mostraron una mayor actividad NK ( $p < 0,05$ ) y una menor proliferación en respuesta a la ConA ( $p < 0,05$ ) en comparación a los valores correspondientes obtenidos en los machos. Considerando el grupo de SM, las hembras mostraron menores valores de proliferación en respuesta a ConA ( $p < 0,05$ ) que los machos en el timo.

#### **4.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre la función inmunitaria y el estrés oxidativo en ratas macho.**

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos de un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración así como de los efectos de la ansiedad en respuesta al mismo sobre la funcionalidad y el estrés oxidativo de los leucocitos esplénicos en ratas macho viejas, se recogen en las **Tablas** de la **9** hasta la **11** y en las **Figuras 36, 37, 38, 39**.

Como se puede observar en la **Tabla 9**, atendiendo a los resultados obtenidos en el “laberinto en cruz elevado”, las ratas aisladas permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del aparato (expresado en porcentaje) con respecto a los individuos agrupados ( $p < 0,05$ , **Fig. 36**), lo que indicaría que el aislamiento social aumentó significativamente los **niveles de ansiedad** en estos animales.

## CONDUCTA DE ANSIEDAD LABERINTO EN CRUZ ELEVADO



**Figura 36.** Conducta de ansiedad, determinada mediante el porcentaje (%) de tiempo empleado en los brazos abiertos del “laberinto en cruz elevado”, en ratas macho viejas ( $20 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. ‡ $p < 0,05$  representan las diferencias entre Aislados y Agrupados, sin tener en cuenta los niveles de ansiedad. \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en Agrupados. •• $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Estas diferencias observadas en los niveles de ansiedad entre animales aislados y agrupados podrían atribuirse a las ratas aisladas con alta ansiedad (HA), que permanecieron mucho menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto en comparación con las ratas agrupadas e incluso con las ratas aisladas de baja ansiedad (LA) ( $p < 0,01$  en ambos casos) (**Fig.36**).

## Resultados

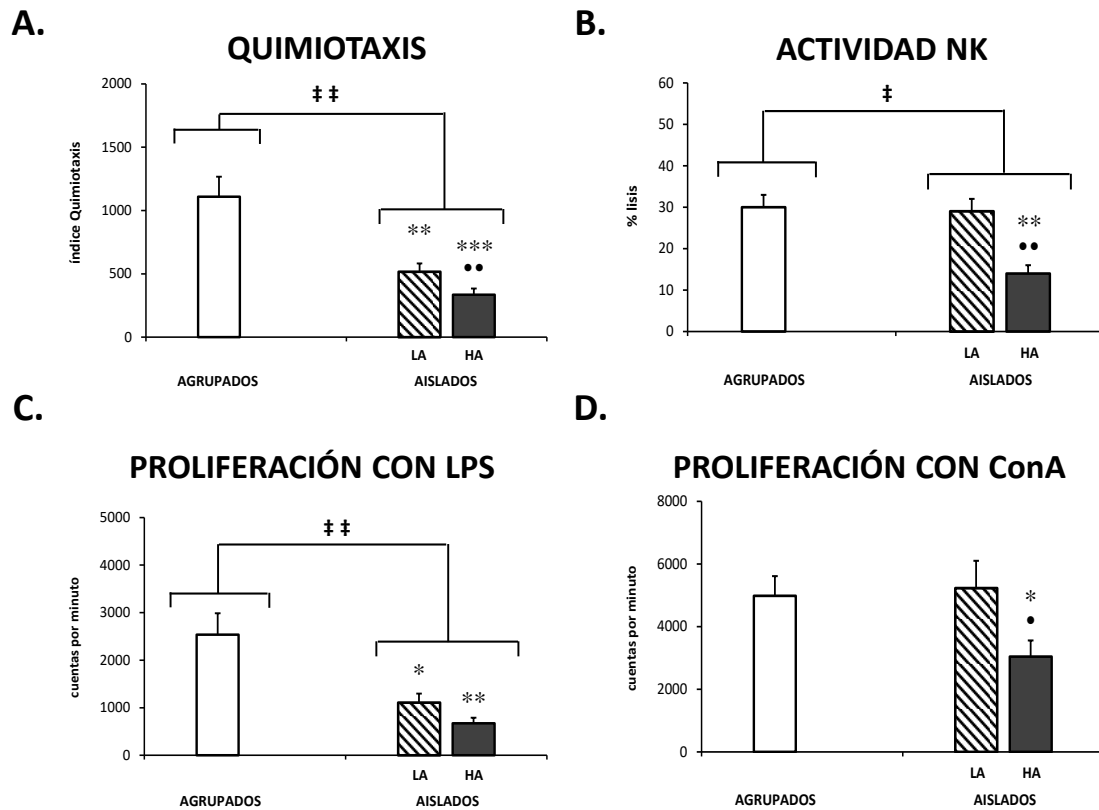
**Tabla 9. Conducta de ansiedad, valorada en el “laberinto en cruz elevado”, y funciones inmunitarias de leucocitos esplénicos en ratas macho viejas (20±1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados).**

Laberinto en cruz elevado	
<b>Tiempo en brazos abiertos (%)</b>	
Agrupados	20±5
Aislados	6±1 ‡
LA	10±2
HA	1±1 ** ●●
<b>Funciones de leucocitos esplénicos</b>	
<b>Índice de quimiotaxis (nº leucocitos)</b>	
Agrupados	1109±158
Aislados	416±49 ‡‡
LA	517±65 **
HA	335±49 *** ●●
<b>Actividad Natural Killer (% lisis)</b>	
Agrupados	30±3
Aislados	21±3 ‡
LA	29±3
HA	14±2 ** ●●
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>	
<b>En respuesta a LPS</b>	
Agrupados	2538±449
Aislados	865±127 ‡‡
LA	1106±193 *
HA	671±120 **
<b>En respuesta a ConA</b>	
Agrupados	4986±626
Aislados	4015±590
LA	5229±871
HA	3043±518 * ●

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (actividad NK y proliferación). ‡‡p<0,01, ‡p<0,05 representan las diferencias entre Aislados y Agrupados, sin tener en cuenta los niveles de ansiedad. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor en Agrupados. ●●p<0,01, ●p<0,05 con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

En cuanto a los datos obtenidos en la funcionalidad de los leucocitos esplénicos, recogidos en la **Tabla 9**, las ratas aisladas mostraron menores capacidad de **quimiotaxis** (p<0,01), **actividad citotóxica NK** (p<0,05) y **proliferación** en respuesta al **LPS** (p<0,01) con respecto a los animales agrupados (**Fig. 37 A, B Y C**, respectivamente). No obstante, el aislamiento no pareció ejercer efecto alguno sobre la respuesta proliferativa en presencia de **ConA** (**Fig. 37D**).





**Figura 37. Quimiotaxis (A), actividad citotóxica NK (B) y proliferación en respuesta al LPS (C) y la ConA (D) de leucocitos esplénicos en ratas macho viejas (20±1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados).** Cada barra representa la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (actividad NK y proliferación). ‡‡p<0,01, ‡p<0,05 representan las diferencias entre Aislados y Agrupados, sin tener en cuenta los niveles de ansiedad. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, p<0,05 con respecto al correspondiente valor en Agrupados. ••p<0,01, •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

Teniendo en cuenta los niveles de ansiedad presentados por los animales aislados, se observa que los leucocitos esplénicos de las ratas aisladas con baja ansiedad (LA) mostraron menor **quimiotaxis** (p<0,01) (**Fig. 37A**) y menor **capacidad de proliferación al LPS** (p<0,05) (**Fig. 37C**) que los animales agrupados. No obstante, fueron los animales aislados con alta ansiedad (HA) los que presentaron el mayor deterioro de las funciones inmunitarias valoradas, mostrando sus leucocitos la menor quimiotaxis (p<0,001 con respecto a las ratas agrupadas y p<0,01 con respecto a las aisladas LA), la más reducida **actividad citotóxica NK** (p<0,01 con respecto a los agrupados y a los aislados LA) y la menor **respuesta proliferativa** al LPS (p<0,01 en comparación con los animales agrupados) y a la **ConA** (p<0,05 con

## Resultados

respecto a los agrupados y a los aislados LA) (Fig. 37A-D, respectivamente).

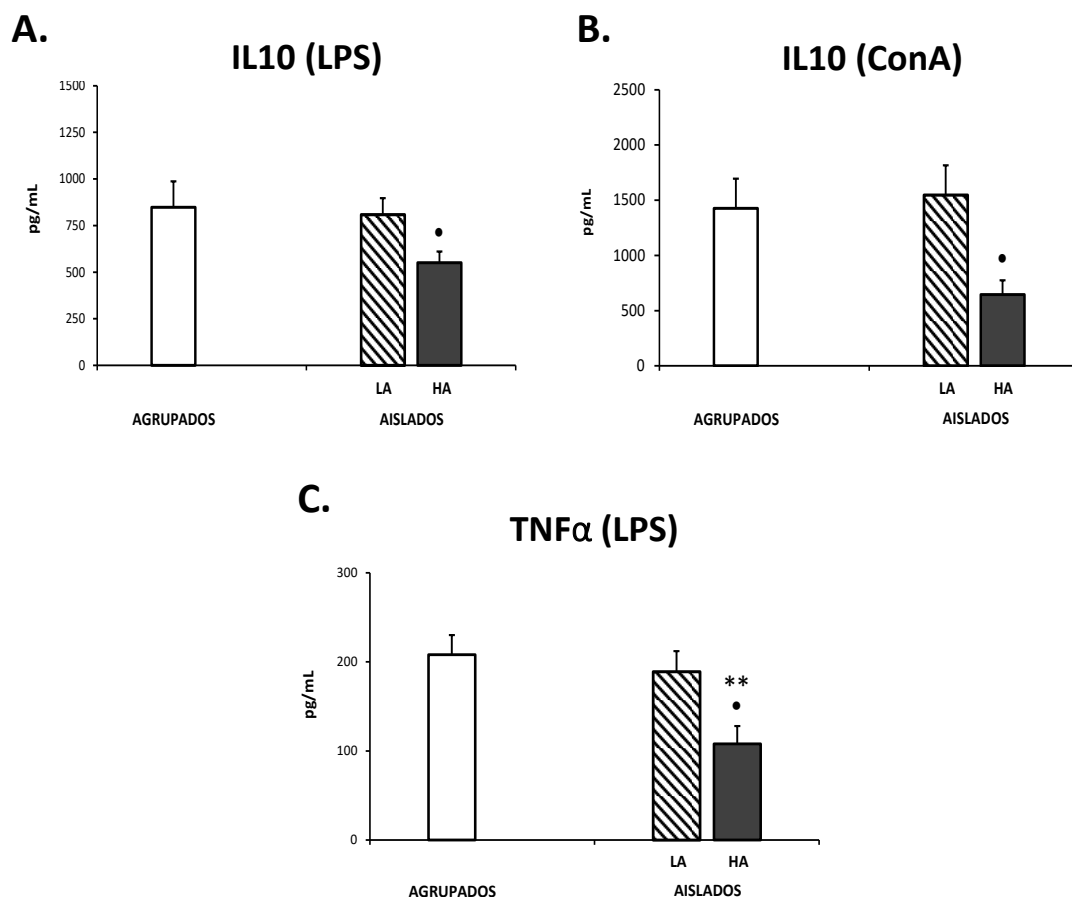
**Tabla 10.** Concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , de la citoquina anti-inflamatoria IL10 y de la citoquina reguladora IL2 secretadas por los leucocitos esplénicos en cultivo en presencia de los mitógenos LPS y ConA en ratas macho viejas (20 $\pm$ 1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados).

Concentraciones de citoquinas		
	LPS	Con A
<b>IL1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>		
Agrupados	31 $\pm$ 4	24 $\pm$ 3
Aislados	23 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2
LA	21 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2
HA	25 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>		
Agrupados	208 $\pm$ 22	116 $\pm$ 16
Aislados	153 $\pm$ 20	106 $\pm$ 11
LA	189 $\pm$ 23	112 $\pm$ 18
HA	108 $\pm$ 20 ** •	99 $\pm$ 13
<b>IL10 (pg/mL)</b>		
Agrupados	848 $\pm$ 139	1427 $\pm$ 268
Aislados	695 $\pm$ 69	1147 $\pm$ 219
LA	809 $\pm$ 88	1547 $\pm$ 269
HA	551 $\pm$ 60 •	646 $\pm$ 128 •
<b>IL2 (pg/mL)</b>		
Agrupados	60 $\pm$ 5	1503 $\pm$ 171
Aislados	59 $\pm$ 6	1688 $\pm$ 132
LA	61 $\pm$ 8	1718 $\pm$ 231
HA	56 $\pm$ 10	1650 $\pm$ 120

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de los valores obtenidos en 4-9 animales. \*\*p<0,01 con respecto al correspondiente valor en Agrupados. •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en las **concentraciones de citoquinas secretadas** por los leucocitos esplénicos en cultivo en presencia de los mitógenos LPS y ConA (Tabla 10), el aislamiento no pareció ejercer un efecto significativo en los mismos. No obstante, teniendo en cuenta el grado de ansiedad exhibido por los animales sometidos a aislamiento social, se observa que los leucocitos de las ratas aisladas HA liberaron una menor cantidad de **TNF $\alpha$**  en respuesta al LPS en relación a los animales agrupados (p<0,01) y aislados LA (p<0,05) (Fig. 38B). Así mismo, estos aislados HA también mostraron unas cantidades menores de

**IL10** en presencia de LPS y ConA, con respecto a los animales aislados LA ( $p < 0,05$  en ambos casos) (**Fig. 38A**). No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos de estudio en las concentraciones de  $\text{TNF}\alpha$  secretadas en presencia de ConA ni en las de **IL1 $\beta$**  e **IL2** liberadas en presencia de LPS y ConA (**Tabla 10**).



**Figura 38.** Concentraciones (pg/mL) de la citoquina anti-inflamatoria IL10 liberadas en presencia de LPS (A) y ConA (B) y de la citoquina pro-inflamatoria  $\text{TNF}\alpha$  en presencia de LPS (C) en cultivos de leucocitos esplénicos de ratas macho viejas ( $20 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en Agrupados. \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de necrosis tumoral.

La **Tabla 11** recoge los resultados relativos a los **parámetros de estrés oxidativo** valorados en el bazo de las ratas agrupadas y aisladas (LA y HA). Como se puede observar, los animales aislados HA mostraron una actividad de la enzima **GPx** significativamente menor que la obtenida en los animales agrupados ( $p < 0,01$ ) y aislados LA ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 39A**), mientras que la actividad **XO** de estos animales

## Resultados

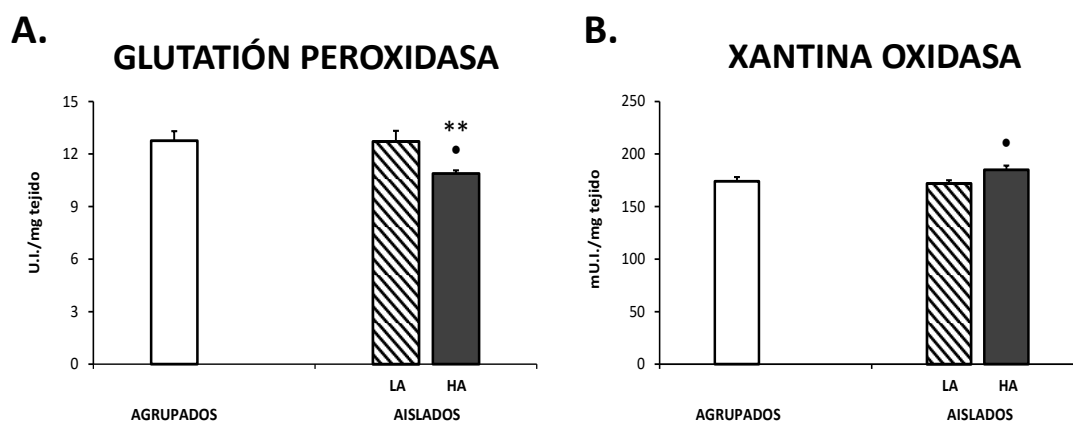
aislados HA se muestra aumentada con respecto a la observada en los animales aislados LA ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 39B**).

**Tabla 11.** Parámetros de estrés oxidativo, niveles de GT y actividades GR, GPx y XO, de bazo en ratas macho viejas ( $20 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados).

Parámetros de estrés oxidativo en bazo	
<b>Niveles de GT (nmol/mg tejido)</b>	
Agrupados	$2 \pm 0,09$
Aislados	$2 \pm 1$
LA	$2 \pm 0,14$
HA	$2 \pm 0,32$
<b>Actividad GR (U.I./mg tejido)</b>	
Agrupados	$5 \pm 0,27$
Aislados	$5 \pm 0,21$
LA	$5 \pm 0,32$
HA	$5 \pm 0,28$
<b>Actividad GPx (U.I./mg tejido)</b>	
Agrupados	$13 \pm 1$
Aislados	$12 \pm 0,43$
LA	$13 \pm 1$
HA	$11 \pm 0,18^{**} \bullet$
<b>Actividad XO (mU.I./mg tejido)</b>	
Agrupados	$174 \pm 4$
Aislados	$179 \pm 3$
LA	$172 \pm 3$
HA	$185 \pm 4 \bullet$

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales.  $^{**}p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en Agrupados.  $\bullet p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, GT: glutatión total, GR: glutatión reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, XO: xantina oxidasa.

No se obtuvieron diferencias significativas en la actividad enzimática **GR** y los niveles de **GT** entre los grupos experimentales (**Tabla 11**).



**Figura 39.** Actividades Glutatión peroxidasa (U.I./mg tejido) (A) y Xantina oxidasa (mU.I./mg tejido) (B) de bazo en ratas macho viejas ( $20 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 8 semanas de duración (Aislados) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad o conviviendo en pareja (Agrupados). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en Agrupados. • $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en Aislados LA. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

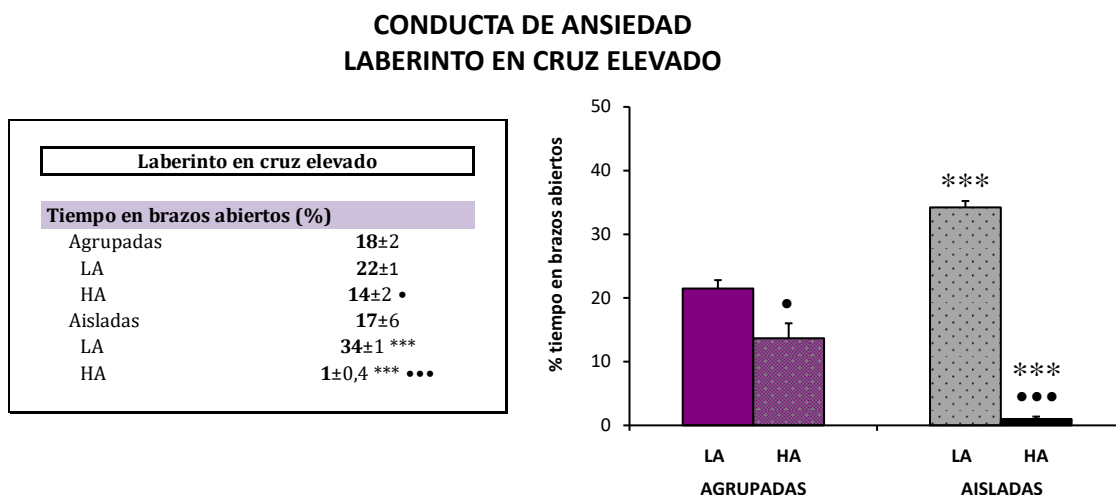
#### 4.3.3. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad en ratones viejos.

Los resultados del estudio de los efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la función de leucocitos peritoneales y la longevidad media en ratones viejos se recogen desde la **Tabla 12** hasta la **14** y desde la **Fig. 40** a la **44**.

Los resultados obtenidos del “laberinto en cruz elevado” (**Fig. 40**) realizado tras haber sometido al grupo de ratones “Aisladas” a un aislamiento social de 4 semanas de duración y previamente a las valoraciones inmunitarias, permitieron clasificar a los individuos “Agrupados” y “Aislados” en función de sus **niveles de ansiedad**. Para determinarlos se utilizó como criterio el porcentaje de tiempo que cada animal permaneció en los brazos abiertos del aparato, en relación al tiempo total de duración de la prueba. Como se puede observar, el aislamiento no indujo un aumento de los niveles de ansiedad de los ratones viejos, de manera que tanto las “Agrupadas” como las “Aisladas” permanecieron el mismo tiempo en los brazos abiertos del laberinto. No obstante sí se observan diferencias significativas en la respuesta de ansiedad a la prueba dentro de cada uno de los grupos de estudio, fundamentalmente en las “Aisladas”, lo que permitió subclasificar a los individuos en animales con “baja ansiedad” (LA), que permanecieron más tiempo en los brazos abiertos con respecto al valor medio de su grupo, y con “alta ansiedad” (HA), con un porcentaje

## Resultados

superior que la media de su grupo. Así, entre los ratones agrupados se observa que los HA permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del aparato que los LA estabulados en similares condiciones ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12. Conducta de ansiedad (%tiempo en brazos abiertos), valorada en el “laberinto en cruz elevado”, de ratones hembra viejas (17±1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.** Cada barra representa la media ± error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. ••• $p < 0,001$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Por su parte, las mayores diferencias en cuanto a los niveles de ansiedad se dieron dentro de los individuos aislados, de manera que los clasificados como ratones aislados HA mostraron un porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del aparato muy inferior al de sus congéneres aislados socialmente, clasificados como “Aisladas” LA ( $p < 0,001$ ), y al de los individuos agrupados con similares niveles de ansiedad o “Agrupadas” HA ( $p < 0,001$ ). Además, cabe destacar que los ratones aislados LA fueron los que presentaron la respuesta menos ansiosa al enfrentarse al laberinto, dado que son los animales que más tiempo permanecen en los brazos abiertos del aparato en relación al resto de grupos de estudio, pudiendo ser ésta la razón por la que en el presente experimento no se ha observado que el aislamiento social ejerciera efecto alguno sobre los niveles de ansiedad de los animales.

Los datos relativos a los parámetros de **función** inmunitaria valorados en los **macrófagos** peritoneales se muestran en la **Tabla 12**. Como se puede observar, el aislamiento hizo que la **quimiotaxis** de

estas células (**Fig. 41A**) fuese menor que en las “Agrupadas” ( $p<0,001$ ).

**Tabla 12. Funciones de macrófagos peritoneales de ratones hembra viejas ( $17\pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas), con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.**

Funciones de macrófagos	
<b>Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)</b>	
Agrupadas	456 $\pm$ 40
LA	481 $\pm$ 38
HA	424 $\pm$ 84
Aisladas	228 $\pm$ 17 ###
LA	251 $\pm$ 24 **
HA	204 $\pm$ 20 *
<b>Índice de fagocitosis (nº bolas de látex)</b>	
Agrupadas	328 $\pm$ 13
LA	322 $\pm$ 16
HA	335 $\pm$ 24
Aisladas	314 $\pm$ 19
LA	302 $\pm$ 17
HA	331 $\pm$ 42
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>	
Agrupadas	49 $\pm$ 3
LA	52 $\pm$ 4
HA	45 $\pm$ 2
Aisladas	54 $\pm$ 1
LA	55 $\pm$ 1
HA	54 $\pm$ 1

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por duplicado. ### $p<0,001$  representa las diferencias entre “Agrupadas” y “Aisladas”. \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Consecuentemente, tanto los macrófagos de los individuos aislados LA como los de los HA mostraron una menor capacidad de quimiotaxis con respecto a la observada en los animales estabulados en grupo con similares niveles de ansiedad ( $p<0,01$  entre animales LA y  $p<0,05$  entre animales HA). No obstante, la ansiedad no parece ejercer algún efecto en este parámetro tanto en cuanto no se obtuvieron diferencias significativas entre los animales LA y HA ni

Tabla 13. Funciones de linfocitos peritoneales de ratones hembra viejas (17±1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.

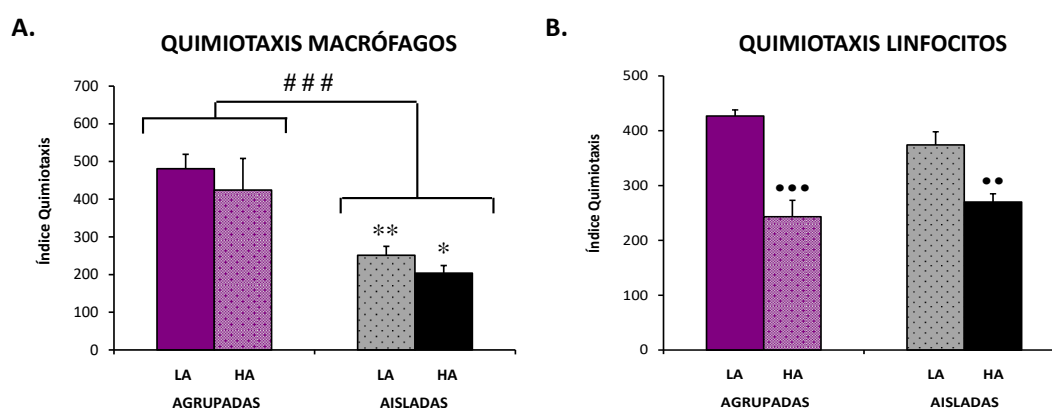
Funciones de linfocitos	
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>	
Agrupadas	335±38
LA	427±11
HA	243±30 •••
Aisladas	322±24
LA	374±24
HA	270±15 ••
<b>Proliferación</b>	
<b>Basal (cuentas por minuto)</b>	
Agrupadas	3091±648
LA	1397±191
HA	4785±115 •••
Aisladas	3441±308
LA	2843±204 ***
HA	4189±405 •
<b>Capacidad de estimulación proliferativa LPS (%)</b>	
Agrupadas	326±85
LA	544±44
HA	108±3 •••
Aisladas	156±15 T
LA	142±22 ***
HA	170±21 *
<b>Capacidad de estimulación proliferativa ConA (%)</b>	
Agrupadas	323±78
LA	515±57
HA	130±5 •••
Aisladas	118±18 #
LA	119±27 ***
HA	117±26

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (proliferación). #p<0,05 y T 0,05>p<0,1 representan las diferencias entre "Agrupadas" y "Aisladas". \*\*\*p<0,001 y \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor en "Agrupadas" con similares niveles de ansiedad. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, T: tendencia estadística.



agrupados ni aislados socialmente. Por su parte, no se observa ningún efecto ni del aislamiento, ni de la respuesta de ansiedad al mismo, ni de la ansiedad en los agrupados, en la **capacidad fagocítica** de los macrófagos, no dándose diferencias significativas entre los grupos de estudio ni en el índice ni en la eficacia de fagocitosis.

En la **Tabla 13**, se muestran los resultados obtenidos en las **funciones** estudiadas en los **linfocitos peritoneales**. En cuanto a la **quimiotaxis** de estas células (**Fig. 41B**), se observa que los animales HA tanto en “Agrupadas” como “Aisladas” mostraron menores valores de este parámetro con respecto a los ratones LA estabulados en similares condiciones a las suyas ( $p < 0,001$  en agrupadas y  $p < 0,01$  en aisladas).



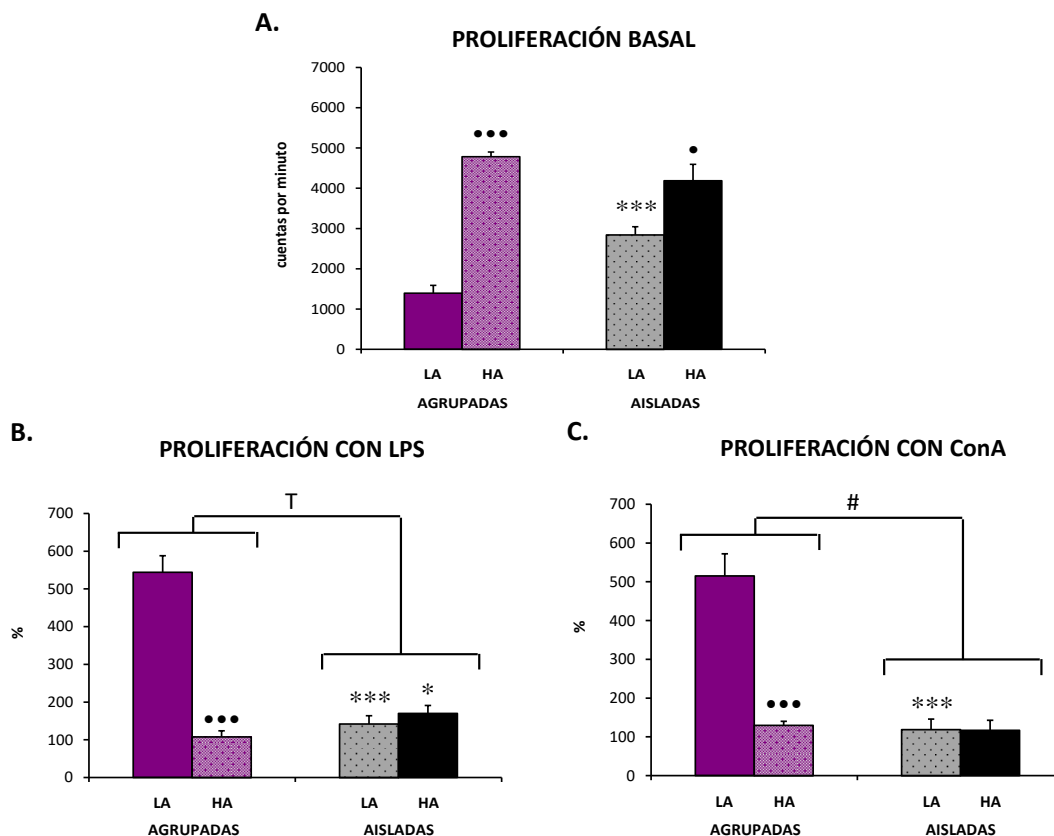
**Figura 41. Quimiotaxis de macrófagos (A) y de linfocitos (B) peritoneales de ratones hembra viejas ( $17 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por duplicado. ### $p < 0,001$  representa las diferencias entre “Agrupadas” y “Aisladas”. \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Por tanto, parece que es la ansiedad, y no el aislamiento ni la respuesta de ansiedad al mismo, la que ejerce un efecto negativo sobre la capacidad de movilidad de los linfocitos hacia el foco inflamatorio. Con respecto a los resultados de proliferación linfocitaria, el aislamiento no afecta a la **proliferación basal** (**Fig. 42A**) de manera que no se obtuvieron diferencias significativas entre las “Agrupadas” y las “Aisladas”. No obstante, se observa una mayor proliferación espontánea de los linfocitos en los animales que responden con baja ansiedad al aislamiento (aislados LA) con respecto a los agrupados con similares niveles de ansiedad ( $p < 0,001$ ). Además, la ansiedad indujo cambios en este parámetro ya que tanto las agrupadas HA como las aisladas HA presentaron un aumento de la proliferación basal con

## Resultados

respecto a los animales LA estabulados en similares condiciones ( $p < 0,001$  para las agrupadas HA y  $p < 0,05$  para las aisladas HA).

En cuanto a la respuesta proliferativa de los linfocitos peritoneales en presencia de los mitógenos LPS y ConA (**Tabla 13**), se observa que ésta es casi similar para ambos estímulos. Así, la **proliferación estimulada con LPS (Fig. 42B)** resultó menor en las “aisladas” con respecto a las “agrupadas”, si bien esta diferencia queda en tendencia estadística. Atendiendo a la respuesta de ansiedad de los ratones al aislamiento, esta respuesta proliferativa al LPS es dual, de forma que es menor en las aisladas LA con respecto a las agrupadas LA ( $p < 0,001$ ) y mayor en las aisladas que responden con alta ansiedad al aislamiento (aisladas HA) que en las agrupadas con altos niveles de ansiedad (HA) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 42. Proliferación basal (A) y en presencia de los mitógenos LPS (B) y ConA (C) de linfocitos peritoneales de ratones hembra viejas (17±1 meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.** Cada barra representa la media ± error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por triplicado. # $p < 0,05$  y T  $0,05 > p < 0,1$  representan las diferencias entre “Agrupadas” y “Aisladas”. \*\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. ••• $p < 0,001$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, T: tendencia estadística.

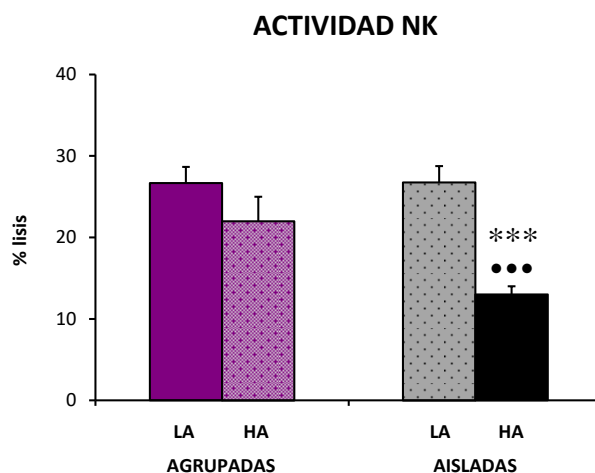
Finalmente, la ansiedad parece afectar a este parámetro sólo en los individuos agrupados ya que los HA mostraron menor proliferación que los LA estabulados también en grupo ( $p < 0,001$ ). En relación a la **proliferación en presencia de ConA (Fig. 42C)**, ésta resultó menor en los animales aislados con respecto a los agrupados ( $p < 0,05$ ). Así mismo, los linfocitos de los animales aislados que LA proliferaron menos en comparación con los agrupados con similares niveles de ansiedad ( $p < 0,001$ ). Además, se observa que las agrupadas HA mostraron una respuesta de proliferación mucho menor que las agrupadas LA ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 14.** Actividad citotóxica NK de leucocitos peritoneales de ratones hembra viejas ( $17 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad.

<b>Actividad Natural killer</b>	
<b>Actividad Natural killer (% lisis)</b>	
Agrupadas	<b>24<math>\pm</math>2</b>
LA	<b>27<math>\pm</math>2</b>
HA	<b>22<math>\pm</math>3</b>
Aisladas	<b>19<math>\pm</math>3</b>
LA	<b>27<math>\pm</math>2</b>
HA	<b>13<math>\pm</math>1 ** ●●●</b>

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 4-10 valores obtenidos de ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por triplicado. \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en "Agrupadas" con similares niveles de ansiedad. ●● $p < 0,001$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

En cuanto a los resultados de la **actividad citotóxica NK (Tabla 14 y Fig. 43)**, sólo los leucocitos de los animales aislados con altos niveles de ansiedad o aisladas HA son los que muestran la menor actividad NK, con respecto a las agrupadas de similares niveles de ansiedad (agrupadas HA) ( $p < 0,01$ ) así como en relación a los animales aislados LA ( $p < 0,001$ ).

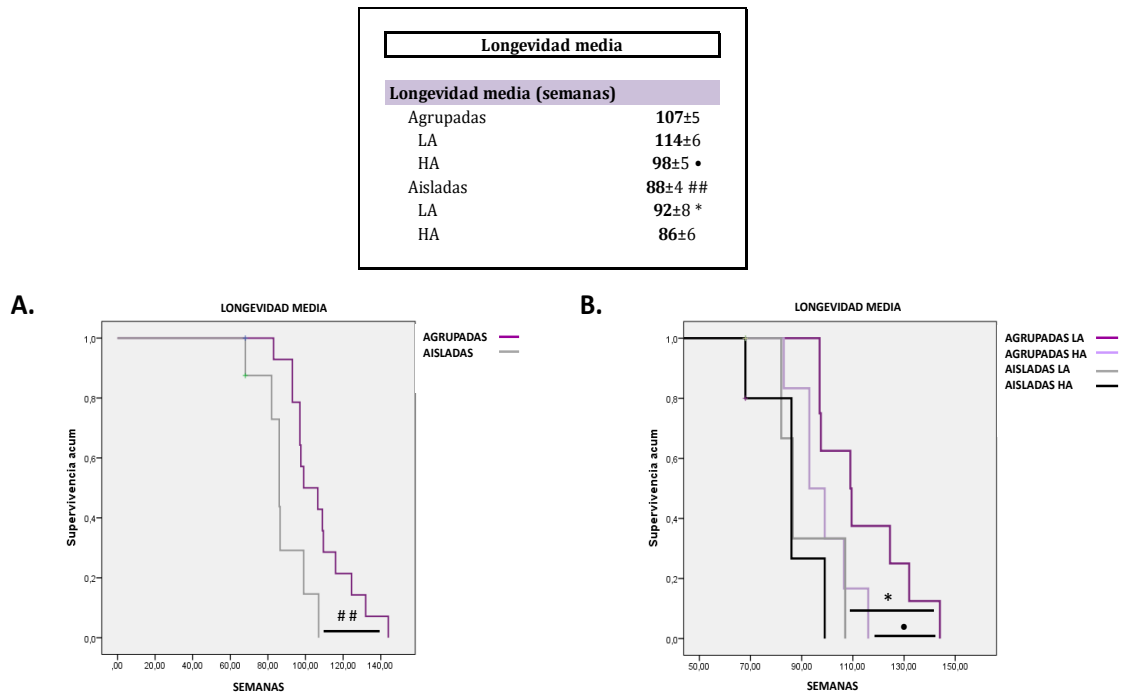


**Figura 43.** Actividad citotóxica NK de leucocitos peritoneales de ratones hembra viejas ( $17 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por triplicado. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, NK: *Natural killer*.

Tras realizar las valoraciones inmunitarias, los animales del estudio permanecieron estabulados en las mismas condiciones (en grupo o aislados socialmente) y se siguieron de forma individualizada hasta el momento de su muerte natural para evaluar los posibles efectos del aislamiento social, de la respuesta de ansiedad al mismo y de la ansiedad sobre su esperanza de vida. Los resultados obtenidos respecto al análisis de la longevidad media realizado en este estudio se muestran en la **Fig. 44**.

Como se puede observar en la **Fig. 44**, el aislamiento social redujo la **longevidad media** de los ratones viejos en relación a los estabulados en grupo ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 44A**). Además, como se puede observar en la **Fig. 44B**, tanto las aisladas menos ansiosas (LA) como las más ansiosas (HA) vivieron menos que las agrupadas con similares niveles de ansiedad, siendo esta diferencia sólo significativa en el caso de las aisladas LA ( $p < 0,05$ ). Además, si bien se observa que tener altos niveles de ansiedad (HA) redujo la esperanza de vida media de los animales agrupados y los aislados con respecto a los animales LA estabulados en condiciones similares, sólo se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el caso de las agrupadas ( $p < 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 44.** Longevidad media de ratones hembra viejas ( $17 \pm 1$  meses de edad) sometidas a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (Aisladas) o estabuladas en grupo (Agrupadas) (A) y con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad (B). Se representa la media  $\pm$  error estándar de 4-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. ## $p < 0,01$  representa las diferencias entre “Agrupadas” y “Aisladas”. \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en “Agrupadas” con similares niveles de ansiedad. • $p < 0,05$  con respecto al valor obtenido en los individuos LA estabulados en similares condiciones. LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

### 4.3.4. Efectos del aislamiento social y de la ansiedad sobre la conducta y la función inmunitaria y el estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad.

Desde la **Tabla 15** a la **Tabla 21** y desde la **Figura 45** a la **51** se recogen los resultados obtenidos del estudio de los efectos del aislamiento social y la ansiedad sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales y sobre la longevidad de ratones adultos “intermedios”. Se recuerda que se denomina “intermedios” a los ratones que no son PAM o NPAM.

Los resultados del estudio conductual se muestran a continuación en las **Tablas 15, 16, 17, 18 y 19**.

## Resultados

**Tabla 15. Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre las capacidades sensoriomotoras de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC)**

**A.**

	AC	AA
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>		
<b>Reflejos</b>		
Reflejo visual (% animales con respuesta)	100	100
Reflejo extensor posterior (% animales con respuesta)	100	100
<b>Cuerda tirante</b>		
Vigor muscular (% animales que no caen)	67	0 ***
% de animales que asumen el riesgo	30	0 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	2±0,5	0,5±0,2 **
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	78	25 **
Coordinación motora (% prueba completada)	44	0 **
Latencia de llegada (s)	44±3	0 ***
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	56	13 ***
Tracción (% animales con prensilidad media)	13	11
Tracción (% animales con prensilidad mínima)	33	75 ***

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001 y \*\*p<0,01 representan las diferencias entre AC y AA. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente.

**Tabla 15 (cont.). Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre las capacidades sensoriomotoras de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad.**

**B.**

	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>				
<b>Reflejos</b>				
Reflejo visual (% animales con respuesta)	100	100	100	100
Reflejo extensor posterior (% animales con respuesta)	100	100	100	100
<b>Cuerda tirante</b>				
Vigor muscular (% animales que no caen)	100	40 ΔΔΔ	0 ...	0 ...
% de animales que asumen el riesgo	60	0 ΔΔΔ	0 ...	0
Coordinación motora (segmentos recorridos)	4±0,4	1 ΔΔ	1	0,3±0,2
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	100	60 ΔΔΔ	25 ...	25 ...
Coordinación motora (% prueba completada)	50	40	0 ...	0 ...
Latencia de llegada (s)	50±3	39±4 ΔΔΔ	0	0
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	75	40 ΔΔΔ	25 ...	0 ... ΔΔΔ
Tracción (% animales con prensilidad media)	25	0 ΔΔΔ	20	0 ΔΔΔ
Tracción (% animales con prensilidad mínima)	25	40 Δ	50 ..	100 ... ΔΔΔ

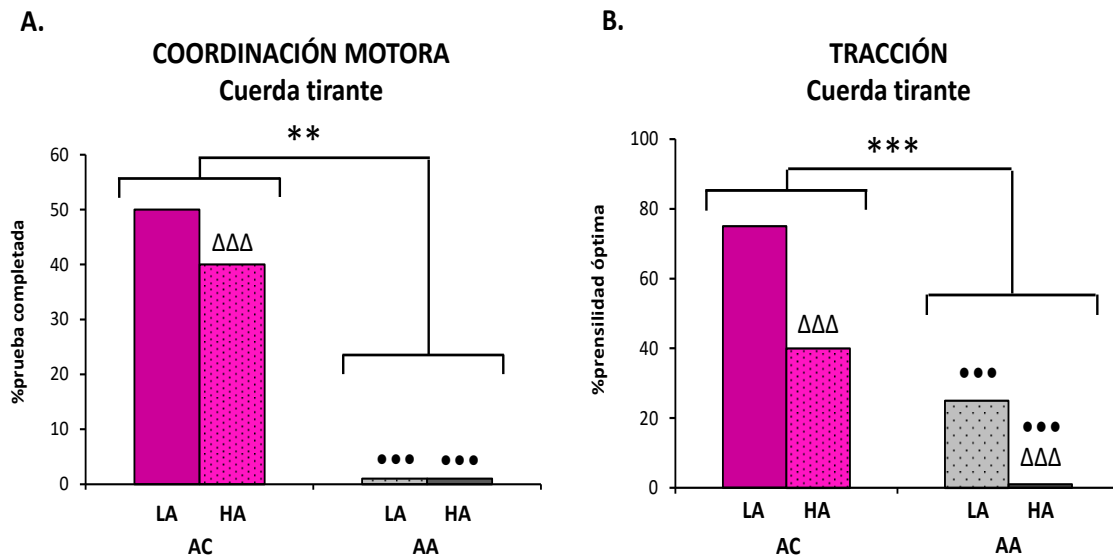
Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. ...p<0,001 y ..p<0,01 con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. ΔΔΔp<0,001, ΔΔp<0,01 y Δp<0,05 con

respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Como se puede observar en la **Tabla 15A**, los resultados extraídos de la “cuerda tirante”, muestran como el aislamiento indujo un deterioro generalizado de las **capacidades sensoriomotoras** evaluadas en esta prueba conductual (**Tabla 15A**). Así, todos los ratones AA caen al lecho, a diferencia de lo observado en los AC ( $p<0,001$ ), lo que indicaría que el aislamiento produjo un deterioro del **vigor muscular**. En relación a los individuos AC, cabe destacar que de aquellos animales que caen de la cuerda, un 30% asumen el “**riesgo**”, es decir, evalúan la altura a la que se encuentran y deciden tirarse de ella sin realizar la prueba (hecho no observado en los AA). Por su parte, los AA también mostraron una peor **coordinación motora** ya que una menor proporción de estos ratones recorrieron al menos un segmento de la cuerda y ninguno fue capaz de finalizar con éxito la prueba (**Fig. 45A**), en comparación con los AC ( $p<0,01$  en ambos parámetros). Consecuentemente, también se observa que los AA mostraron una peor **tracción** que los AC, de manera que, atendiendo al porcentaje de individuos que presentaron una prensilidad óptima (esto es, capaces de sujetarse con las patas anteriores y posteriores y con la cola a la cuerda), dicho porcentaje es mucho menor en los ratones aislados (AA) en relación a los animales conviviendo en grupo (AC) ( $p<0,001$ ) (**Fig. 45B**). Teniendo en cuenta los niveles de ansiedad mostrados por los ratones tanto agrupados como aislados (**Tabla 45B**), se observa que los altos niveles de ansiedad (HA) indujeron un deterioro de los parámetros evaluados en la “cuerda tirante”, empeorando algunas capacidades sensoriomotoras de los individuos AA e incluso afectando a las de los AC, aunque en este sentido, en general, los AA HA presentaron peor vigor muscular, coordinación motora y tracción que los AC HA. En los AA HA se apreció una peor tracción que en los AA con bajos niveles de ansiedad (LA) ya que ninguno de los ratones pertenecientes a este grupo mostraron una prensilidad óptima ( $p<0,001$ ) (**Fig. 45B**). También los AC HA mostraron peor vigor muscular que los AC LA ( $p<0,001$ ), y ningún animal de AC HA fue capaz de asumir el “riesgo”, a diferencia de los AC LA ( $p<0,001$ ). Con respecto a la coordinación motora, una menor proporción de los AC HA fueron capaces de recorrer más de un segmento de la cuerda en relación a los AC LA ( $p<0,001$ ). Por el contrario, no se obtuvieron diferencias significativas debidas a los niveles de ansiedad en los animales agrupados, en cuanto al porcentaje de ratones que consiguieron completar la prueba con éxito (**Fig. 45A**), si bien se observa que

## Resultados

aquellos AC HA que sí la finalizaron lo hicieron en menos tiempo que los AC LA ( $p < 0,001$ ). Finalmente, en relación a la tracción, cabe destacar que un porcentaje menor de los AC HA presentó una prensilidad óptima en comparación con los AC LA ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 45B**).



**Figura 45.** Coordinación motora (% animales que completan la prueba) y tracción (% animales con prensilidad óptima) en la “cuerda tirante” de ratones adultos “intermedios” ( $9 \pm 1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA). Cada barra representa el % de animales que cumple el criterio analizado de 4-9 animales estudiados. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  representan las diferencias entre AC y AA. ••• $p < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. ΔΔΔ $p < 0,001$  con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento exploratorio y de algunas respuestas de ansiedad se recogen en las **Tablas 16A y 16B**.



## Resultados

**Tabla 16. Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre el comportamiento exploratorio y las respuestas de ansiedad de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA).**

**A.**

	AC	AA
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>		
<b>Test de esquinas</b>		
Nº de esquinas visitadas	6±1	8±1
% animales que presentan posición erguida	100	100
Número total de posiciones erguidas	7±0,5	8±0,4
% animales que se acicalan	0	13 **
Número total de acicalamientos	0	0,3±0,2
<b>Tablero de agujeros</b>		
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>		
<b>Actividad horizontal</b>		
Deambulación total (DT)	297±23	374±12 **
Deambulación externa (DE)	176±16	239±8 **
Deambulación media (DM)	89±7	101±9
Deambulación interna (DI)	31±3	32±2
Cociente DI/DT (%)	11±1	8±1 *
<b>Actividad exploratoria dirigida</b>		
% animales que exploran agujeros	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	10±1	10±1
Tiempo total explorando agujeros (s)	24±2	21±3
<b>Actividad vertical</b>		
% Animales que presentan posición erguida	100	100
Número total de posiciones erguidas	19±4	13±4
Tiempo de posición erguida (s)	20±4	13±4
<b>Grooming</b>		
% Animales que realizan acicalamiento	88	55 **
Número total de acicalamientos	1±0,3	2±1
Tiempo de acicalamiento (s)	4±1	3±1
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>		
% Animales que defecan	63	55
Número de bolas fecales	2±0,5	1±0,4
% Animales que orinan	0	0
<b>Laberinto T</b>		
<b>Actividad horizontal</b>		
Tiempo cruce intersección (s)	10±1	11±1
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	97±30	57±8
<b>Actividad vertical</b>		
% Animales que presentan posición erguida	63	89 **
Número total de posiciones erguidas	2±1	2±1
Tiempo de posición erguida (s)	2±1	2±1
<b>Acicalamiento</b>		
% Animales que realizan acicalamiento	25	22
Número total de acicalamientos	0,4±0,2	0,2±0,1
Tiempo de acicalamiento (s)	1±1	0,5±0,3
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>		
% Animales que defecan	25	11
Número de bolas fecales	1±0,4	0,4±0,3
% animales que orinan	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*p<0,01 y \*p<0,05 representan las diferencias entre AC y AA. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente.

## Resultados

**Tabla 16 (cont.). Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre el comportamiento exploratorio y las respuestas de ansiedad de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA).**

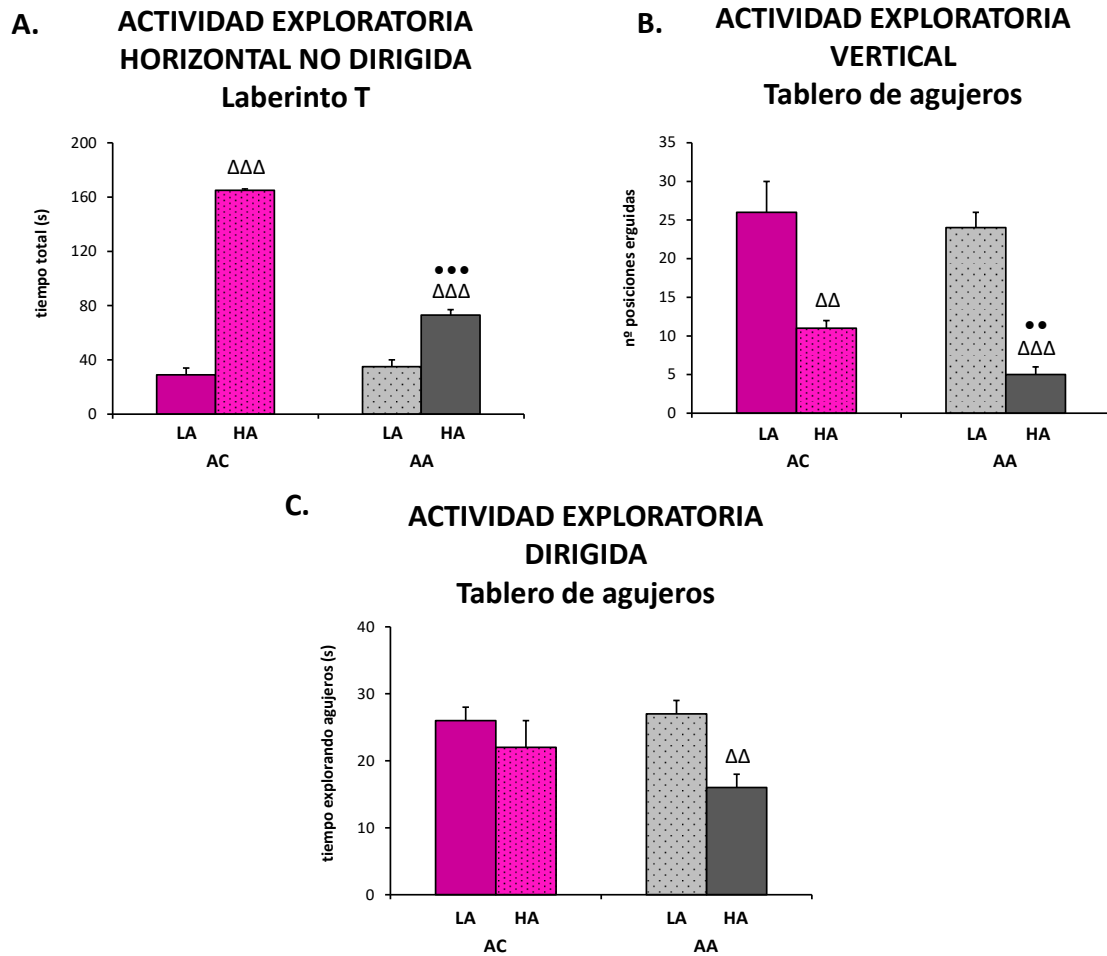
B.	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>				
<b>Test de esquinas</b>				
Nº de esquinas visitadas	6±1	6±1	5±2	10±1 Δ
% animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	8±0,5	7±0,5	8±0,5	8±0,4
% animales que se acicalan	0	0	0	25 *** ΔΔΔ
Número total de acicalamientos	0	0	0	0,5±0,5
<b>Tablero de agujeros</b>				
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>				
<i>Actividad horizontal</i>				
Deambulación total (DT)	351±29	253±17 Δ	394±26	360±10 ***
Deambulación externa (DE)	208±20	151±19	226±14	249±9 ***
Deambulación media (DM)	106±9	76±3 Δ	126±10	84±9 Δ
Deambulación interna (DI)	38±3	26±2 Δ	38±3	27±2 Δ
Cociente DI/DT (%)	11±1	11±1	10±0,3	8±1 Δ
<i>Actividad exploratoria dirigida</i>				
% animales que exploran agujeros	100	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	12±1	9±1	12±2	8±1 T
Tiempo total explorando agujeros (s)	26±2	22±4	27±2	16±2 ΔΔ
<i>Actividad vertical</i>				
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	26±4	11±1 ΔΔ	24±2	5±1 ** ΔΔΔ
Tiempo de posición erguida (s)	28±4	11±0,4 ΔΔ	24±3	4±1 *** ΔΔΔ
<i>Acicalamiento</i>				
% Animales que realizan acicalamiento	75	100 ΔΔΔ	50 ***	60 ***
Número total de acicalamientos	1±0,3	2±0,4 T	1±0,4	3±2
Tiempo de acicalamiento (s)	3±1	5±1	2±1	4±2
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>				
% Animales que defecan	50	75 ΔΔ	50	60 •
Número de bolas fecales	2±1	1±1	1±1	1±1
% Animales que orinan	0	0	0	0
<b>Laberinto T</b>				
<i>Actividad horizontal</i>				
Tiempo cruce intersección (s)	9±1	12±2	11±1	12±1
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	29±5	165±1 ΔΔΔ	35±5	73±4 *** ΔΔΔ
<i>Actividad vertical</i>				
% Animales que presentan posición erguida	75	50 ΔΔ	100 ***	80 *** ΔΔΔ
Número total de posiciones erguidas	2±0,5	2±1	2±1	2±1
Tiempo de posición erguida (s)	2±0,5	2±1	2±1	2±1
<i>Acicalamiento</i>				
% Animales que realizan acicalamiento	0	50 ΔΔΔ	25 ***	20 ***
Número total de acicalamientos	0	1±0,4	0,3±0,2	0,2±0,2
Tiempo de acicalamiento (s)	0	3±1 Δ	0,3±0,2	1±0,5
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>				
% Animales que defecan	0	50 ΔΔΔ	0	20 *** ΔΔΔ
Número de bolas fecales	0	1±1	0	1±1
% animales que orinan	0	0	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. ΔΔΔp<0,001, ΔΔp<0,01, Δp<0,05 y T 0,1>p<0,05 con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, T: tendencia estadística.

En cuanto a los datos obtenidos en la “prueba de las esquinas”, el aislamiento social sólo indujo un mayor porcentaje de animales que se **acicalan** en los AA con respecto a los AC ( $p < 0,01$ ) (**Tabla 16A**). Y, teniendo en cuenta los niveles de ansiedad (**Tablas 16B**), se aprecia que esta diferencia observada entre los AA y los AC, se debe a los AA más ansiosos (AA HA), que fueron los únicos animales que se acicalaron durante la “prueba de esquinas”, en relación al resto de grupos del estudio ( $p < 0,001$  con respecto a los AA LA y a los AC LA).

En cuanto a los efectos del protocolo de aislamiento social sobre los parámetros conductuales analizados en el “tablero de agujeros” (**Tablas 15A**), comenzando por la **actividad exploratoria no dirigida** o espontánea, se observa que los animales aislados AA deambularon más que los AC ( $p < 0,01$ ), concretamente los AA mostraron una mayor deambulación por la zona externa del tablero ( $p < 0,01$ ). Este efecto *a priori* beneficioso, podría explicarse teniendo en cuenta los niveles de ansiedad. Así, en la **Tabla 16B**, se observa que ser más ansioso afectaría a la deambulación especialmente en los ratones AC. De hecho los AC HA fueron los animales que presentaron la menor deambulación total no sólo con respecto a los animales AC LA ( $p < 0,05$ ) sino también con respecto a los AA HA ( $p < 0,001$ ). Además, tanto los AC HA como los AA HA deambularon menos por las zonas media e interna del tablero con respecto a los animales AC LA y AA LA ( $p < 0,05$  para todas las comparaciones). Si bien no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la deambulación externa entre los animales HA y LA estabulados en similares condiciones, cabe destacar que de nuevo los individuos AC HA deambularon menos por la zona externa del tablero en comparación con los AC LA. En relación a la **actividad exploratoria dirigida**, el aislamiento no parece afectar a esta capacidad, no obteniéndose diferencias significativas en los parámetros utilizados para evaluar dicha conducta entre los AC y los AA (**Tabla 16A**). No obstante, como se puede observar en la **Tabla 16B**, vivir aislado y ser más ansioso (AA HA) deterioró la capacidad de exploración dirigida, de manera que los AA HA realizaron un menor número de exploraciones en agujeros y dedicaron menos tiempo (**Fig. 46C**) a esta conducta con respecto a los AA LA (tendencia estadística para el primer parámetro y  $p < 0,01$  para el segundo). En cuanto a la **actividad exploratoria vertical**, como se puede observar en la **Tabla 16A**, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados entre AA y AC. No obstante, la ansiedad sí que parece afectar negativamente a la exploración vertical. Así, los animales más ansiosos (HA), tanto AC como AA, se irguieron menos (**Fig. 46B**) y dedicaron

## Resultados



**Figura 46.** Actividades exploratorias horizontal no dirigida (tiempo total para explorar el “laberinto T”) (A), vertical (nº posiciones erguidas en el “tablero de agujeros”) (B) y dirigida (tiempo explorando agujeros en el “tablero de agujeros”) (C) de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA). Cada barra representa la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. ••• $p < 0,001$  y •• $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. ΔΔΔ $p < 0,001$  y ΔΔ $p < 0,01$  con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

menos tiempo a esta conducta con respecto a los animales AC LA y AA LA ( $p < 0,01$  en las comparaciones entre individuos AC y  $p < 0,001$  entre individuos AA). Además, cabe destacar que este deterioro es mucho más notable en los animales con altos niveles de ansiedad que viven aislados (grupo AA HA), de manera que presentaron menos erguimientos y dedicaron menos tiempo a los mismos en comparación con los animales con altos niveles de ansiedad estabulados en grupo (grupo AC HA) ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). Finalmente, el aislamiento parece afectar en parte a las **respuestas de ansiedad** analizadas en el “tablero de agujeros” ya que los animales AA

mostraron una menor proporción de deambulación interna en relación a la total con respecto a los AC ( $p<0,05$ ) (**Fig. 47B**), no hallándose diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las conductas de acicalamiento, de defecación y urinaria. No obstante, la ansiedad mostrada por los individuos sí modifica de forma más generalizada estos parámetros, particularmente en los AC HA (**Tabla 16B**). Así, los AA HA presentaron la menor deambulación interna con respecto a la total en relación a los AA LA ( $p<0,05$ ) (**Fig. 47B**). En cuanto a la conducta de acicalamiento, todos los AC HA se acicalaron al menos una vez durante la prueba, a diferencia de lo observado en los AC LA ( $p<0,001$ ) e incluso en los AA HA ( $p<0,001$ ). También, un mayor porcentaje de estos animales AC HA defecaron con respecto a los AC LA ( $p<0,01$ ) y los AA HA ( $p<0,05$ ).

En cuanto a los resultados obtenidos en el “laberinto T”, sólo se observa que un mayor porcentaje de los individuos AA presentan posición erguida con respecto a los AC ( $p<0,01$ ), no hallándose diferencias significativas debidas al aislamiento social en el resto de parámetros analizados en esta prueba conductual (**Tabla 16A**). Por su parte, teniendo en cuenta los niveles de ansiedad de los animales, el efecto de los mismos fue más generalizado (**Tablas 16B**). Así, los ratones más ansiosos (HA) mostraron un deterioro de la actividad exploratoria horizontal, de forma que tanto los AC HA como los AA HA tardaron mucho más tiempo en explorar en su totalidad el laberinto que los AC LA y los AA LA ( $p<0,001$  en ambos casos), siendo este deterioro más patente en los AC HA (**Fig. 46A**). De igual forma, los individuos AC HA y AA HA mostraron una deteriorada capacidad de exploración vertical en el “laberinto T”, ya que un menor porcentaje de los mismos se irguieron al menos una vez durante la prueba en comparación al porcentaje obtenido en los AC LA y AA LA ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente). De nuevo, fueron los AC HA los que presentaron la menor capacidad exploratoria vertical entre todos los grupos de estudio, incluso inferior a la mostrada por los AA HA ( $p<0,001$ ). Por su parte, en cuanto a las respuestas de ansiedad, una mayor proporción de los individuos AC HA se acicalaron (**Fig. 47C**) y defecaron con respecto a los AC LA ( $p<0,001$  en ambos casos), e incluso fue mayor a lo que hicieron los AA HA ( $p<0,001$  para ambos parámetros).

En la **Tabla 17**, se muestran los resultados del estudio de la **conducta de ansiedad** realizado en el “laberinto en cruz elevado” después de las 4 semanas de aislamiento social. Como se puede observar en la **Tabla 17A**, aparentemente el aislamiento no indujo

## Resultados

Tabla 17. Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre la conducta de ansiedad en el “laberinto en cruz elevado” de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA).

A.

	AC	AA
<b>C. Conducta de ansiedad. Laberinto en cruz elevado</b>		
<b>Brazos abiertos</b>		
Número de entradas	4±1	3±1
Tiempo (s)	31±6	20±4
% tiempo	10±2	7±1
<b>Brazos cerrados</b>		
Número de entradas	12±1	13±1
Tiempo (s)	199±11	212±16
% tiempo	66±4	77±5
<b>Zona central</b>		
Tiempo (s)	70±37	68±12
% tiempo	24±12	16±4 T

B.

	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
<b>C. Conducta de ansiedad. Laberinto en cruz elevado</b>				
<b>Brazos abiertos</b>				
Número de entradas	5±1	2±0,3 Δ	4±1	3±0,5
Tiempo (s)	47±1	18±3 ΔΔ	24±7 •	17±4
% tiempo	16±1	6±1 ΔΔ	8±2 •	6±1
<b>Brazos cerrados</b>				
Número de entradas	11±0,4	13±1 Δ	15±1 •	12±1
Tiempo (s)	204±15	192±19	238±22	194±20
% tiempo	68±5	64±6	79±7	74±7
<b>Zona central</b>				
Tiempo (s)	49±2	30±2 ΔΔ	38±14 •••	89±16 •• Δ
% tiempo	16±1	30±2 ΔΔΔ	13±5 •••	20±6

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. T 0,1>p<0,05 representa las diferencias entre AC y AA. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. ΔΔΔp<0,001, ΔΔp<0,01, Δp<0,05 con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, T: tendencia estadística.

cambios en los niveles de ansiedad de los ratones adultos, sólo hallándose un porcentaje menor de tiempo de permanencia en la zona central del aparato en los animales AA con respecto a los AC, quedándose las diferencias en tendencia significativa a nivel estadístico. Sin embargo, más cambios se observan en esta conducta

teniendo en cuenta los niveles de ansiedad de los individuos (**Tabla 17B**). Así, los aislados menos ansiosos (AA LA) permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos (**Fig. 47A**), entraron más veces en los brazos cerrados y mostraron un menor tiempo en la zona central del aparato con respecto a los animales agrupados con baja ansiedad (AC LA) ( $p<0,05$ ,  $p<0,05$  y  $p<0,001$  respectivamente). En cuanto a los AA HA, se observa que permanecieron más tiempo en el centro del laberinto en relación a los AC HA ( $p<0,01$ ) y los AA LA ( $p<0,05$ ). Por su parte, los animales AC HA entraron menos veces y permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del aparato (**Fig. 47A**) ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ , respectivamente), entraron más veces en los brazos cerrados ( $p<0,05$ ) y permanecieron más tiempo (expresado en %) en la zona central ( $p<0,001$ ) en comparación con los AC LA.

La **Tabla 18** muestra cómo **evolucionaron los niveles de ansiedad** de los ratones adultos “intermedios” tras las 4 semanas de duración del protocolo de aislamiento social, al haberse sometido al “laberinto en cruz elevado” antes y después de dicho protocolo. Como se puede observar, los ratones tanto agrupados (AC) como aislados (AA) vieron aumentados sus niveles de ansiedad pasado el periodo de tiempo de 4 semanas, especialmente en el caso de los AA. Así, los AC y los AA disminuyeron el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del aparato después de las 4 semanas, siendo la disminución mayor en los AA ( $p<0,05$  y  $p<0,01$  respectivamente). Si bien también se observa que, en porcentaje de tiempo, se dio esa disminución, las diferencias no alcanzaron la significación estadística (**Fig. 48A**). Consecuentemente, los AC y los AA aumentaron el tiempo de permanencia en los brazos cerrados del aparato tras las 4 semanas de protocolo con respecto a los valores obtenidos antes del mismo, tanto en valores absolutos ( $p<0,05$  en ambas comparaciones) como expresado en porcentaje en relación al tiempo total de duración de la prueba ( $p<0,001$  en ambos casos). Además, tanto en los animales AC como en los AA disminuyó el porcentaje de tiempo que permanecieron en la zona central del laberinto, tras las 4 semanas del protocolo, siendo este descenso más acusado en el caso de los AA ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ , respectivamente).

## Resultados

**Tabla 18. Conducta de ansiedad en el “laberinto en cruz elevado” de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) antes y después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC).**

		Antes del aislamiento	Después del aislamiento
<b>C. Conducta de ansiedad. Laberinto en cruz elevado</b>			
<b>Brazos abiertos</b>			
Número de entradas	AC	5±1	4±1
	AA	4±1	3±1
Tiempo (s)	AC	60±17	31±6 &
	AA	50±7	20±4 &&
% tiempo	AC	12±3	10±2
	AA	10±1	7±1
<b>Brazos cerrados</b>			
Número de entradas	AC	12±0,4	12±1
	AA	14±0,4	13±1
Tiempo (s)	AC	157±12	199±11 &
	AA	144±13	212±16 &
% tiempo	AC	31±3	66±4 &&&
	AA	29±3	77±5 &&&
<b>Zona central</b>			
Tiempo (s)	AC	83±7	70±17
	AA	106±9	68±12 &&&
% tiempo	AC	58±3	24±12 &
	AA	61±2	16±4 &&&

Los datos expresan la media ± error estándar de 8-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. &&&p<0,001, &&p<0,01 y &p<0,05 representan las diferencias con respecto al valor correspondiente antes del aislamiento. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente.



## Resultados

**Tabla 19. Conducta de ansiedad en el “laberinto en cruz elevado” de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) antes y después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos (HA) niveles de ansiedad antes de dicho aislamiento.**

		Antes del aislamiento	Después del aislamiento
<b>C. Conducta de ansiedad. Laberinto en cruz elevado</b>			
<b>Brazos abiertos</b>			
Número de entradas			
	AC		
	LA	7±0,4	5±1
	HA	2±1	2±0,3
	AA		
	LA	5±0,3	4±1
	HA	3±0,3	3±0,5
Tiempo (s)			
	AC		
	LA	80±6	47±1 T
	HA	35±6	18±3
	AA		
	LA	70±7	24±7 &
	HA	30±4	17±4 &&&
% tiempo			
	AC		
	LA	16±1	16±1
	HA	7±1	6±1
	AA		
	LA	14±2	8±2
	HA	6±1	6±1
<b>Brazos cerrados</b>			
Número de entradas			
	AC		
	LA	12±0,5	11±0,4
	HA	13±1	13±1
	AA		
	LA	14±0,5	15±1
	HA	15±1	12±1 &
Tiempo (s)			
	AC		
	LA	130±13	204±15 &&
	HA	184±5	192±19
	AA		
	LA	108±8	238±22&
	HA	174±12	194±20
% tiempo			
	AC		
	LA	24±3	68±5 &&
	HA	37±1	64±6 &
	AA		
	LA	22±2	79±7 &&
	HA	36±3	74±7 &&

Los datos expresan la media±error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. &&&p<0,001, &&p<0,01, &p<0,05 y T 0,1>p<0,05 representan las diferencias con respecto al valor correspondiente antes del aislamiento. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, T=tendencia estadística.

## Resultados

**Tabla 19 (cont.). Conducta de ansiedad en el “laberinto en cruz elevado” de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) antes y después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA) antes de dicho aislamiento.**

		Antes del aislamiento	Después del aislamiento
<b>C. Conducta de ansiedad. Laberinto en cruz elevado</b>			
<b>Zona central</b>			
<b>Tiempo (s)</b>			
	<b>AC</b>		
	LA	90±32	49±2
	HA	81±10	90±6
	<b>AA</b>		
	LA	122±9	38±14 &&&
	HA	96±13	89±16
<b>% tiempo</b>			
	<b>AC</b>		
	LA	60±6	16±1 &&&
	HA	56±2	30±2 &&&
	<b>AA</b>		
	LA	64±2	13±5 &&&
	HA	58±3	20±6 &&

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. &&&p<0,001 y &&p<0,01 representan las diferencias con respecto al valor correspondiente antes del aislamiento. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente.

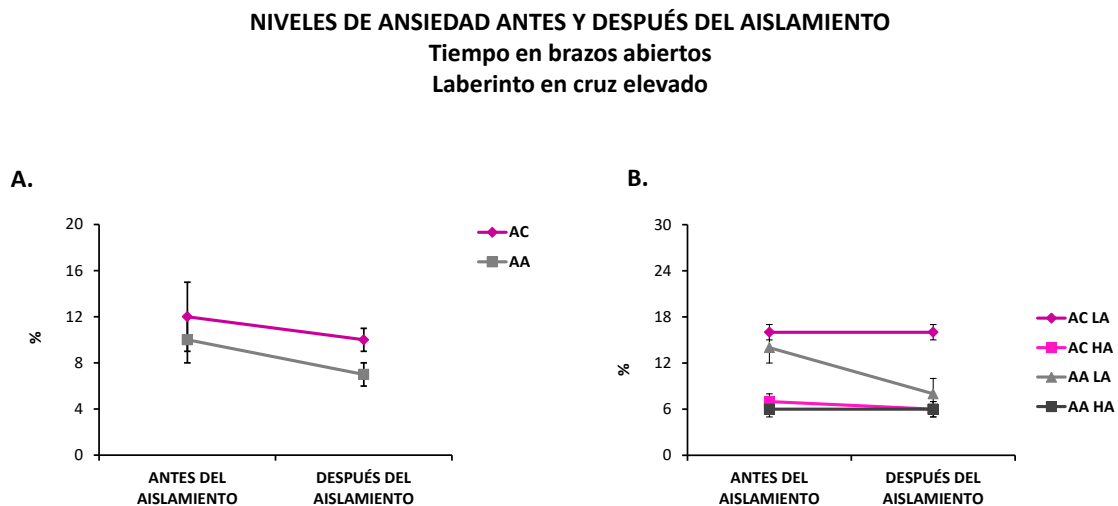
La **Tabla 19**, muestra la evolución de los niveles de ansiedad en los individuos AC y AA tanto LA como HA tras las 4 semanas de protocolo experimental. Atendiendo a los parámetros valorados en los brazos abiertos del “laberinto en cruz elevado”, cabe destacar que los AA LA y los AA HA disminuyeron su tiempo de permanencia en esta zona tras las 4 semanas de aislamiento ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ , respectivamente). No obstante, considerando el porcentaje de tiempo que los animales permanecieron en los brazos abiertos con respecto al tiempo total de la prueba, no se observan estas diferencias (**Fig. 48B**).

En cuanto al porcentaje de tiempo en los brazos cerrados del laberinto, se puede observar que todos los grupos de estudio aumentan de forma notable este parámetro transcurridas las 4 semanas ( $p<0,01$  para los AC LA,  $p<0,05$  para los AC HA y  $p<0,01$  para los AA LA y AA HA). Así mismo, todos los animales redujeron de forma notable el porcentaje de tiempo permanecido en la zona central del

## Resultados

aparato tras las 4 semanas ( $p < 0,001$  para los AC LA, AC HA y AA LA y  $p < 0,01$  para los AA HA).

Tras las valoraciones conductuales, se llevó a cabo un estudio de la funcionalidad y el estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales de todos los individuos del estudio, mostrándose los resultados en las **Tablas 20 y 21**, respectivamente.



**Figura 48.** Evolución de los niveles de ansiedad (% tiempo en brazos abiertos) en el “laberinto en cruz elevado” de ratones adultos “intermedios” ( $9 \pm 1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) (A) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA) (B). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: Low Anxiety o baja ansiedad, HA: High Anxiety o alta ansiedad.

En cuanto a los resultados de las **funciones inmunitarias** evaluadas sin tener en cuenta los niveles de ansiedad mostrados por los animales (**Tabla 20A**), se observa que el protocolo de aislamiento social indujo una reducción de la **capacidad proliferativa** a los mitógenos utilizados: el **LPS** y la **ConA** en los AA, en comparación con los AC ( $p < 0,001$  en ambos casos) (**Figs. 50 A y B**). No obstante, el vivir aislado no pareció afectar a la respuesta de proliferación basal o espontánea de los leucocitos peritoneales. Así mismo, el protocolo de aislamiento no modificó la **actividad citotóxica NK**, de manera que no se obtuvieron diferencias significativas en este parámetro entre los animales AC y los AA (**Fig. 50C**).

Por su parte, los resultados de las valoraciones inmunitarias teniendo en cuenta los niveles de ansiedad de cada ratón antes de someterse al protocolo de aislamiento (**Tablas 21B**), mostraron que en el caso de la proliferación de los linfocitos en respuesta a LPS, los

## Resultados

leucocitos de los AA, tanto LA como HA, mostraron una menor capacidad proliferativa con respecto a los animales AC con similares niveles de ansiedad ( $p<0,001$  en ambos casos). Así mismo, tener altos niveles de ansiedad también afecta a este parámetro, ya que los animales AC HA mostraron una menor respuesta proliferativa que los AC LA ( $p<0,001$ ) (**Fig. 49A**).

**Tabla 20.** Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre funciones de leucocitos peritoneales de ratones adultos “intermedios” ( $9\pm 1$  meses de edad) después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA).

**A.**

Función linfocitos		AC	AA
<b>Proliferación</b>			
Basal (cuentas por minuto)		4304 $\pm$ 323	4340 $\pm$ 290
Capacidad de estimulación proliferativa LPS (%)		403 $\pm$ 17	243 $\pm$ 16 ***
Capacidad de estimulación proliferativa ConA (%)		407 $\pm$ 9	181 $\pm$ 5 ***
<b>Actividad Natural killer</b>			
<b>Actividad Natural killer (% lisis)</b>			
		13 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1

**B.**

Función linfocitos	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
<b>Proliferación</b>				
Basal (cuentas por minuto)	3714 $\pm$ 292	5091 $\pm$ 127 $\Delta$	4546 $\pm$ 397	4135 $\pm$ 454
Capacidad de estimulación proliferativa LPS (%)	438 $\pm$ 8	355 $\pm$ 3 $\Delta\Delta\Delta$	241 $\pm$ 29 ***	228 $\pm$ 16 ***
Capacidad de estimulación proliferativa ConA (%)	410 $\pm$ 15	402 $\pm$ 9	189 $\pm$ 5 ***	172 $\pm$ 5 *** $\Delta$
<b>Actividad Natural killer</b>				
<b>Actividad Natural killer (% lisis)</b>				
	20 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1 $\Delta\Delta\Delta$	12 $\pm$ 1 ***	8 $\pm$ 0,2 $\Delta\Delta$

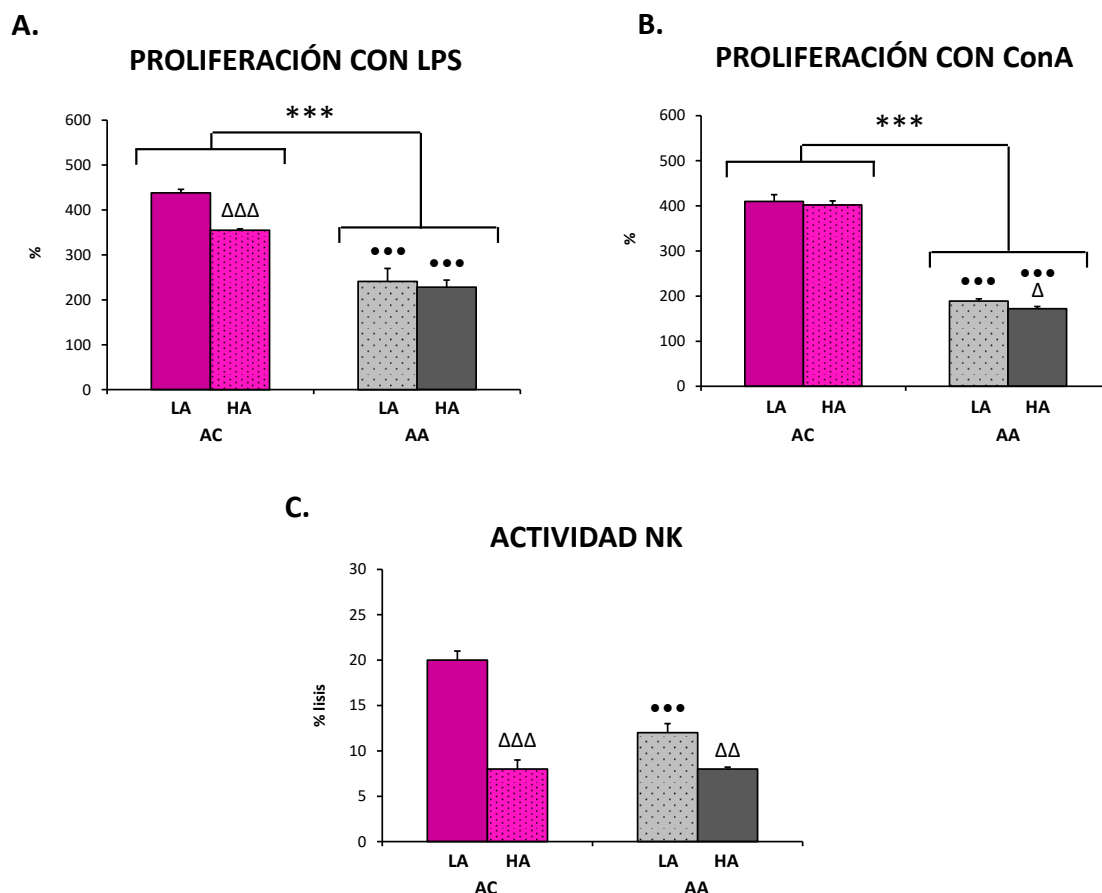
Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. \*\*\* $p<0,001$  representa las diferencias entre AC y AA. \*\*\* $p<0,001$  con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad.  $\Delta\Delta\Delta p<0,001$ ,  $\Delta\Delta p<0,01$ ,  $\Delta p<0,05$  con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

De forma similar, en los cultivos de leucocitos con ConA las células de los ratones AA LA y AA HA proliferaron menos que los AC LA y los AC HA ( $p<0,001$ , respectivamente). Además, cabe destacar que tener altos

## Resultados

niveles de ansiedad y sufrir aislamiento deterioraría de forma notable este parámetro, tanto en cuanto los ratones AA HA presentaron la menor respuesta de proliferación a la ConA de todos los grupos de estudio, con diferencias respecto a los AC HA ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 49B**).

En cuanto a la actividad citotóxica NK (**Fig. 49C**), los individuos AA LA tuvieron menor actividad que los AC LA ( $p < 0,001$ ). Por su parte, tener altos niveles de ansiedad, independientemente de las condiciones de estabulación, deterioraría este parámetro de manera que los AC HA y los AA HA presentaron una menor actividad NK con respecto a los AC LA y AC HA ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).



**Figura 49.** Respuesta de proliferación al LPS (A) y a la ConA (B) y actividad citotóxica NK (C) de leucocitos peritoneales de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA). Cada barra representa la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por triplicado. \*\*\* $p < 0,001$  representa las diferencias entre AC y AA. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad.  $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ ,  $\Delta\Delta p < 0,01$ ,  $\Delta p < 0,05$  con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, NK: *Natural killer*.

## Resultados

Tabla 21. Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre parámetros de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA).

**A.**

Parámetros estrés oxidativo	AC	AA
Niveles intracelulares de GSH (nmol/10 <sup>6</sup> células)	84±4	86±13
Niveles intracelulares de GSSG (nmol/10 <sup>6</sup> células)	5±0,1	5±0,2
Cociente GSSG/GSH	0,07±0,005	0,07±0,014
Actividad XO (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	2±0,13	3±0,23
Actividad CAT (U.I./10 <sup>6</sup> células)	11±2	5±1 *
Actividad GR (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	63±9	35±3 *
Actividad GPx (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	534±62	620±95

**B.**

Parámetros estrés oxidativo	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
Niveles intracelulares de GSH (nmol/10 <sup>6</sup> células)	92±8	80±5	59±18	99±14
Niveles intracelulares de GSSG (nmol/10 <sup>6</sup> células)	5±0,05	5±0,2	5±0,2	5±0,3
Cociente GSSG/GSH	0,06±0,005	0,07±0,006	0,1±0,04	0,05±0,01

Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*p<0,05 representa las diferencias entre AC y AA. ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. Δp<0,05 con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, XO: xantina oxidasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, GPx: Glutatión peroxidasa.

## Resultados

**Tabla 21 (cont.). Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre parámetros de estrés oxidativo Funciones de leucocitos peritoneales de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) después de ser sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o bien permaneciendo estabulados en grupo (grupo AC) (A) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA) (B).**

**B.**

Parámetros estrés oxidativo	AC		AA	
	LA	HA	LA	HA
Actividad XO (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	2±0,2	2±0,1	3±0,2	2±0,2 Δ
Actividad CAT (U.I./10 <sup>6</sup> células)	10±2	12±4	6±1 •	4±0,2 ••Δ
Actividad GR (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	81±9	53±9	29±1 ••	41±2 Δ
Actividad GPx (mU.I./10 <sup>6</sup> células)	414±90	582±72	504±136	706±129

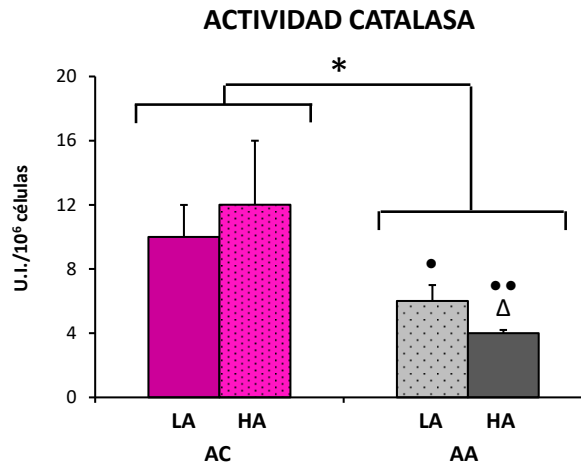
Los datos expresan la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*p<0,05 representa las diferencias entre AC y AA. ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. Δp<0,05 con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, XO: xantina oxidasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, GPx: Glutatión peroxidasa.

En la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos del estudio de los parámetros de estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales.

Como se puede observar en la **Tabla 21A**, en general, el protocolo de aislamiento social no pareció ejercer grandes efectos en los parámetros de estrés oxidativo analizados, con la excepción de unas menores actividades enzimáticas de **catalasa (Fig. 50)** y **glutatión reductasa** en los AA con respecto a los AC (p<0,05 en ambos casos).

Teniendo en cuenta los niveles de ansiedad de los individuos del estudio (**Tabla 21B**), sí se observan más cambios en estos parámetros, particularmente en los AA HA. Así, estos animales AA HA presentaron menores actividades **xantina oxidasa**, catalasa (**Fig. 50**) y glutatión reductasa en comparación con los AA LA (p<0,05 en todos los casos) e

incluso con los AC HA en el caso de la actividad catalasa ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 50**). Por su parte, cabe destacar que los AA LA tuvieron menores actividades catalasa y glutatión reductasa con respecto a los AC LA ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). No se hallaron diferencias significativas entre los grupos de estudio en el resto de parámetros de estrés oxidativo analizados.



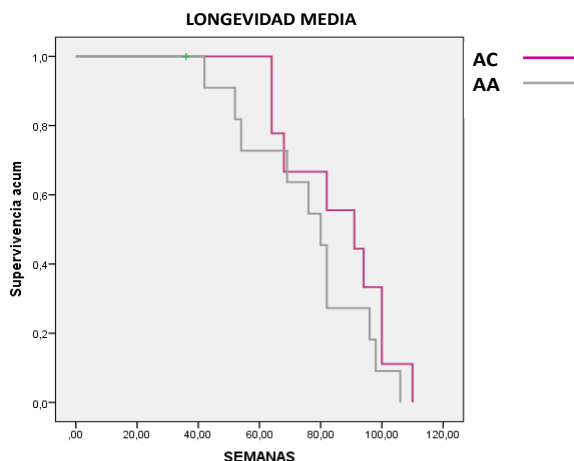
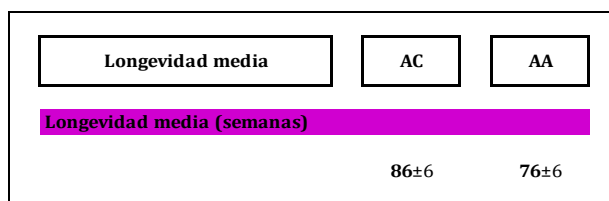
**Figura 50.** Actividad catalasa de leucocitos peritoneales de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social de 4 semanas de duración (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA). Cada barra representa la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \* $p < 0,05$  representa las diferencias entre AC y AA. •• $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en los individuos AC con similares niveles de ansiedad. Δ $p < 0,05$  con respecto a los individuos LA estabulados en iguales condiciones AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.

Tras llevar a cabo las valoraciones funcionales y de estrés oxidativo en los leucocitos, los individuos se mantuvieron estabulados en similares condiciones (en grupo o aislados, según correspondiera) hasta el momento de su fallecimiento por causas naturales, momento que se registró para analizar los efectos del aislamiento social y la ansiedad sobre la **longevidad media** de estos ratones adultos “intermedios”. Los resultados obtenidos del análisis estadístico de dicha longevidad media se muestran en la **Fig. 51** y, como se puede observar, no se obtuvieron efectos significativos ni del aislamiento ni de la ansiedad sobre la longevidad media de los animales del estudio. No obstante, cabe destacar que los ratones AA vivieron menos que los AC, sin llegar a alcanzar esta diferenciación estadística (**Fig. 51A**). Además, consecuentemente y teniendo en cuenta los niveles de ansiedad de los individuos (**Fig. 51B**), se observa que tanto los aislados AA LA como los AA HA alcanzan menores longevidades que los animales estabulados en grupo con similares niveles de ansiedad, aunque tampoco se dieron diferencias estadísticamente significativas.



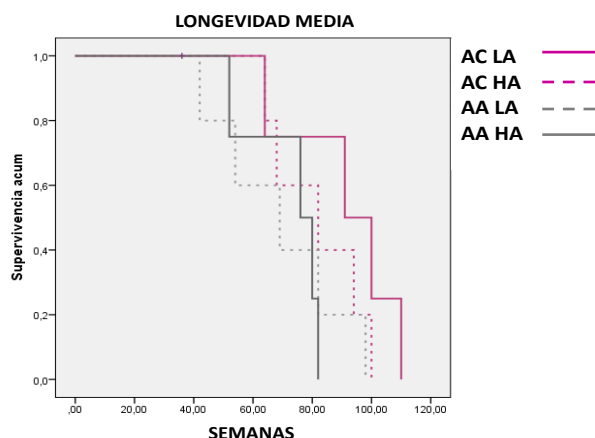
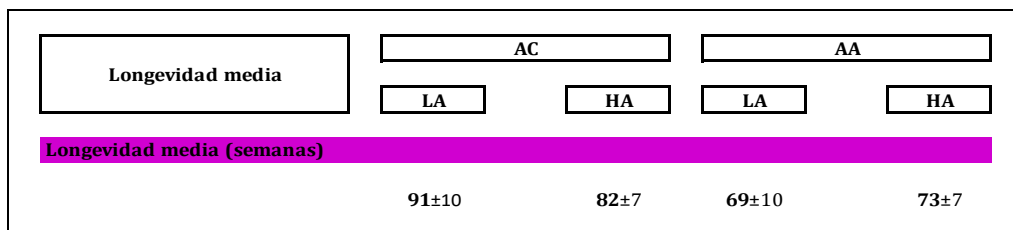
## Resultados

A.



Z

B.



**Figura 51. Efectos del aislamiento (A) y de la ansiedad (B) sobre la longevidad media (semanas) de ratones adultos “intermedios” (9±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de aislamiento social (grupo AA) o estabulados en grupo (grupo AC) con bajos (LA) o altos niveles de ansiedad (HA). Cada valor representa la media ± error estándar de 4-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. AC: ratones adultos “intermedios” controles estabulados en grupo, AA: ratones adultos “intermedios” aislados socialmente, LA: *Low Anxiety* o baja ansiedad, HA: *High Anxiety* o alta ansiedad.**

#### **4.4. ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL PARA MEJORAR PARÁMETROS CONDUCTUALES Y DE FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO. EFECTOS SOBRE LA LONGEVIDAD.**

##### **4.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.**

Los resultados relativos al estudio de los efectos del enriquecimiento ambiental (EA) con juguetes e hidroterapia sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de sus leucocitos peritoneales y en la longevidad media de dichos animales, se recogen desde las **Tabla 22** hasta la **Tabla 25** y desde las **Figura 52** a la **58**.

Las **capacidades sensoriomotoras** evaluadas en los animales del estudio se muestran en la **Tabla 22**. Como se puede observar en relación a los **reflejos**, todos los ratones viejos JV y BV sometidos a EA (tanto con juguetes como a hidroterapia, respectivamente) como los controles adultos CA dieron una respuesta positiva para el reflejo visual, a diferencia de lo observado en los ratones viejos CV no expuestos a ningún tipo de enriquecimiento ( $p < 0,001$  para todos los casos). Con respecto al reflejo extensor posterior, sólo una pequeña proporción de los ratones BV no mostraron dicho reflejo ( $p < 0,001$  con respecto a los CV, JV y CA). Atendiendo a los parámetros sensoriomotores determinados en la “tabla de madera”, el porcentaje de ratones viejos que no caen de la tabla en los grupos JV y BV es similar al obtenido en el grupo CV, lo que indicaría que no hay efecto de las estrategias sobre el **equilibrio** de los individuos. No obstante, se puede observar que los ratones viejos expuestos a EA con juguetes (grupo JV) y los de hidroterapia (grupo BV) mostraron una respuesta menos miedosa en el aparato ya que una mayor proporción de estos animales, con respecto a los CV, evalúan el “**riesgo**” (valorado por los asomamientos que realiza el individuo en la tabla) y lo asumen, es decir, deciden tirarse al lecho desde la tabla en vez de continuar con la prueba ( $p < 0,001$  para JV y  $p < 0,01$  para BV para el parámetro “%animales que evalúan el riesgo” y  $p < 0,01$  para ambos grupos para el parámetro “%animales que asumen el riesgo”). El que los ratones expuestos a EA asuman el “riesgo” de tirarse de la tabla, podría explicar el porqué de la no existencia de diferencias en cuanto al

## Resultados

**Tabla 22. Capacidades sensoriomotoras de ratones viejos (20±1 meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos (9±1 meses de edad; grupo CA) estabulados sin EA.**

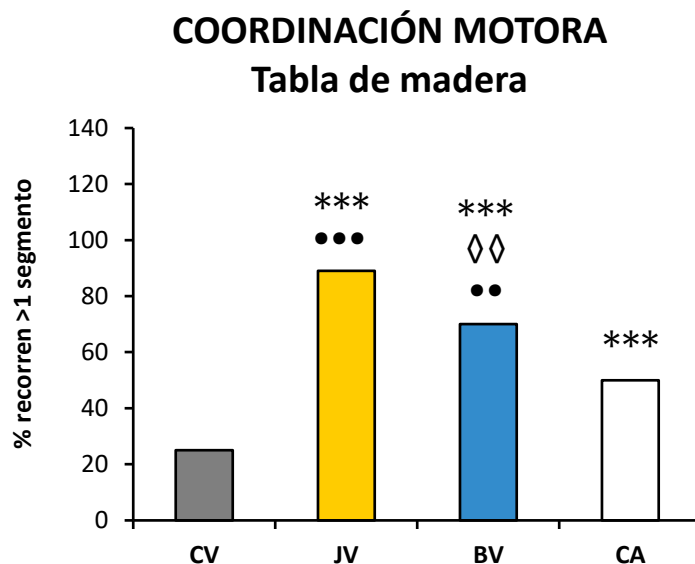
	CV	JV	BV	CA
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>				
<b>Reflejos</b>				
Reflejo visual (% animales con respuesta)	75	100 ***	100 ***	100 ***
Reflejo extensor posterior (% animales con respuesta)	100	100	80 *** ◇◇◇ ...	100
<b>Tabla de Madera</b>				
Equilibrio (% animales que no caen)	75	78 ...	70	67 ***
% animales que evalúan el riesgo	0	56 *** ..	10 ** ◇◇◇ ..	33 ***
% animales que asumen el riesgo	0	11 ** ..	10 ** ..	0
Coordinación motora (segmentos recorridos)	3±1	5±1	4±1	3±0,3
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	25	89 *** ...	70 *** ◇◇ ..	50 ***
Coordinación motora (% prueba completada)	50	38	67 * ◇◇◇ .	50
<b>Cuerda tirante</b>				
Vigor muscular (% animales que no caen)	75	11 *** ...	10 *** ...	83
% de animales que asumen el riesgo	0	0	30 *** ◇◇◇ ...	33 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	2±1	1±0,3	1±0,5	3±1
Coordinación motora (% de recorrer 1 o más segmentos)	75	22 *** ...	20 *** ...	83
Coordinación motora (% prueba completada)	50	0 *** ...	14 *** ◇◇◇ ...	67 *
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	75	44 *** ...	50 *** ...	100 ***
Tracción (% animales con prensilidad media)	0	33 *** ...	13 *** ◇◇ ...	0
Tracción (% animales con prensilidad mínima)	25	22 ...	25 ...	0 ***

Los datos expresan la media ± error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CV. ◇◇◇p<0,001 y ◇◇p<0,01 con respecto al valor obtenido en JV. ...p<0,001, ..p<0,01 y .p<0,05 en relación al valor en CA. EA: enriquecimiento ambiental, CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA.

equilibrio en relación a los CV. Por otro lado, una mayor proporción de animales expuestos a EA son capaces de recorrer más de un segmento de la tabla por lo que tendrían mayor **coordinación motora** que los CV (p<0,001 tanto para los JV como para los BV), sin llegar a los valores observados en los adultos CA (**Fig. 52**). En este parámetro los JV muestran mejores resultados. No obstante, los animales BV presentarían mayor coordinación que los JV en cuanto a que un mayor porcentaje de éstos son capaces de completar la prueba con éxito no sólo con respecto a los controles viejos CV (p<0,05), sino también en relación a los JV (p<0,001) e incluso a los controles adultos CA (p<0,05). Con respecto a los parámetros conductuales evaluados en la “cuerda tirante”, los ratones JV y BV presentaron un mejor **vigor muscular** ya que el porcentaje de individuos expuestos a EA que no cayeron de la cuerda fue mayor que el observado en los controles viejos CV (p<0,001 para ambos casos). Además, en el caso de los individuos BV, un mayor porcentaje de éstos asumieron el “riesgo” de tirarse desde la cuerda al lecho, sin interesarse en continuar con la prueba, en relación a los controles viejos CV, a los JV e incluso a los

controles adultos CA ( $p<0001$  para todos los casos), lo que indicaría una respuesta menos miedosa (al igual que la observada en la “tabla de madera”).

No obstante, ambas estrategias de EA no mejoraron la coordinación motora en la “cuerda tirante”, de manera que un menor porcentaje tanto de los JV como de los BV fueron capaces de recorrer más de un segmento de la cuerda así como de completar la prueba con éxito con respecto a los CV ( $p<0,001$  para todas las comparaciones), estando muy lejos de los valores obtenidos en los controles CA. Por su parte, en cuanto al estudio de la **tracción** realizado en esta prueba, cabe destacar que una menor proporción de ratones expuestos a EA presentaron una prensilidad óptima (esto es, utilizaron las patas anteriores y posteriores y la cola para asirse a la cuerda) en comparación con los controles viejos CV ( $p<0,001$  en ambos casos).



**Figura 52. Coordinación motora (% animales que recorren más de 1 segmento) en la “tabla de madera” de ratones viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9\pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.** Cada barra representa el % de animales que cumple el criterio analizado de 5-9 animales estudiados. \*\*\* $p<0,001$  con respecto al valor correspondiente en CV. ◊◊ $p<0,01$  con respecto al valor obtenido en JV. ••• $p<0,001$  y •• $p<0,01$  en relación al valor en CA. CV=ratones viejos controles no sometidos a EA, JV=ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV=ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA=ratones adultos controles no sometidos a EA.

Los resultados obtenidos del estudio del comportamiento exploratorio y de las respuestas de ansiedad se muestran en la **Tabla 23**. Atendiendo a los resultados de la “prueba de esquinas”, se observa que es el EA con juguetes, y no la hidroterapia, el que ejerce efectos en los animales viejos (JV). Así, los JV visitaron más esquinas y realizaron

## Resultados

**Tabla 23. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones viejos (20±1 meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos (9±1 meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.**

	CV	JV	BV	CA
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>				
<b>Test de esquinas</b>				
Nº de esquinas visitadas	8±0,5	11±1 *	8±1 ◊◊ •	11±1 *
% animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	4±1	7±1 *	4±0,5 ◊◊	7±0,5 *
<b>Campo abierto</b>				
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>				
<b>Actividad horizontal</b>				
Latencia en salir del punto de partida (s)	5±1	2±0,3 * •	2±0,3 *	3±0,3
Latencia en alcanzar la periferia (s)	5±0,3	8±2 *	8±2 *	9±1 **
Deambulación total (DT)	425±7	347±22	466±8 ** ◊◊◊ ••	263±21 *
Deambulación externa (DE)	235±7	179±16 *	223±13	194±9 **
Deambulación media (DM)	174±5	147±7 * ••	220±12 * ◊◊◊ •••	67±13 ***
Deambulación interna (DI)	15±3	22±1 * ••	24±3 * ••	16±1
Cociente DI/DT (%)	4±1	7±1 **	6±1 *	6±1 *
<b>Actividad vertical</b>				
% Animales que realizan posición erguida en el primer minuto	75	100 ***	70 ◊◊◊ •••	100 ***
Latencia de la primera posición erguida (s)	34±10	28±4	35±5	27±3
Número de posiciones erguidas en el primer minuto	6±1	3±1 *	3±1 *	3±0,5 *
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	22±2	32±4 *	29±3 T	37±4 *
Tiempo de posición erguida (s)	22±2	32±4 *	30±2 T	40±3 **
% Animales que realizan erguimiento central	100	100	100	100
<b>Grooming</b>				
% animales que realizan acicalamiento en el pimer minuto	0	0	0	0
% Animales que realizan acicalamiento	100	78 *** ◊◊◊ •••	100	100
Número total de acicalamientos	2±0,4	1±0,4	3±0,3	2±0,4
Tiempo de acicalamiento (s)	6±2	4±1	10±2 ◊ •••	2±0,5 *
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>				
% Animales que defecan	100	89 **	90 **	83 ***
Número de bolas fecales	5±1	3±1	3±0,4 *	2±1 *
% Animales que orinan	0	0	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 y T 0,1>p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CV. ◊◊◊p<0,001, ◊◊p<0,01 y ◊p<0,05 con respecto al valor obtenido en JV. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 en relación al valor en CA. EA: enriquecimiento ambiental, CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, T: tendencia estadística.

## Resultados

**Tabla 23 (cont.). Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones viejos (20±1 meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos (9±1 meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.**

	CV	JV	BV	CA
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>				
<b>Tablero de agujeros</b>				
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>				
<i>Actividad horizontal</i>				
Deambulación total (DT)	316±4	281±7 ** ...	307±13	326±4
Deambulación externa (DE)	184±7	157±4 ** ...	176±9	191±7
Deambulación media (DM)	97±3	86±7	101±5	99±4
Deambulación interna (DI)	35±2	37±2	30±2 ◊ •	36±1
Cociente DI/DT (%)	11±0,5	13±1 * •	10±0,5 ◊◊	11±0,2
<i>Actividad vertical</i>				
% Animales que realizan posición erguida en el primer minuto	100	100	100	100
Latencia de la primera posición erguida (s)	25±6	14±1 *	15±3	13±2 *
Número de posiciones erguidas en el primer minuto	2±0,4	7±1 **	5±1 *	6±1 **
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	20±2	43±5 **	41±3 **	37±3 **
Tiempo de posición erguida (s)	22±3	47±5 **	45±3 ***	39±4 **
<i>Actividad exploratoria dirigida</i>				
% animales que exploran agujeros en el primer minuto	100	100	100	100
Latencia en explorar el primer agujero (s)	35±5	10±4 **	4±1 ***	4±1 ***
Número de exploraciones en agujeros en el primer minuto	2±0,4	2±0,3	2±0,4	3±0,4 **
% animales que exploran agujeros	100	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	9±1	10±1 ••	11±1 ••	15±1 **
Tiempo total explorando agujeros (s)	21±4	39±6 *	31±3 *	31±2 *
Tiempo por exploración de agujero (s)	2±0,1	4±0,3 ** ••	3±0,3	3±0,2 *
<i>Grooming</i>				
% animales que realizan acicalamiento en el pimer minuto	0	0	0	0
% Animales que realizan acicalamiento	100	56 *** •••	80 *** ◊◊◊	83 ***
Número total de acicalamientos	2±0,2	0,3±0,2 ***	1±0,2 ◊	1±0,2 **
Tiempo de acicalamiento (s)	4±0,4	1±1 *	3±1 ◊	2±0,5 **
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>				
% Animales que defecan	100	89 ***	80 ***	83 ***
Número de bolas fecales	5±1	2±1 *	2±1 *	3±1 *
% Animales que orinan	0	0	0	0
<b>Laberinto T</b>				
<i>Actividad horizontal</i>				
Tiempo cruce intersección (s)	7±0,5	8±1	9±1	6±1
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	33±3	31±3 ••	29±3 ••	16±1 ***
<i>Actividad vertical</i>				
% Animales que presentan posición erguida	75	89 * ••	70 ◊◊ •••	100 ***
Número total de posiciones erguidas	1±0,4	6±1 ** ••	3±1	2±0,2
Tiempo de posición erguida (s)	1±0,4	6±1 ** ••	3±1	2±0,2
<i>Acicalamiento</i>				
% Animales que realizan acicalamiento	0	0	0	0
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>				
% Animales que defecan	25	33 •	10 ** ◊◊◊	17
Número de bolas fecales	0,5±0,4	0,6±0,3	0,2±0,2	0,3±0,3
% animales que orinan	0	0	0	0

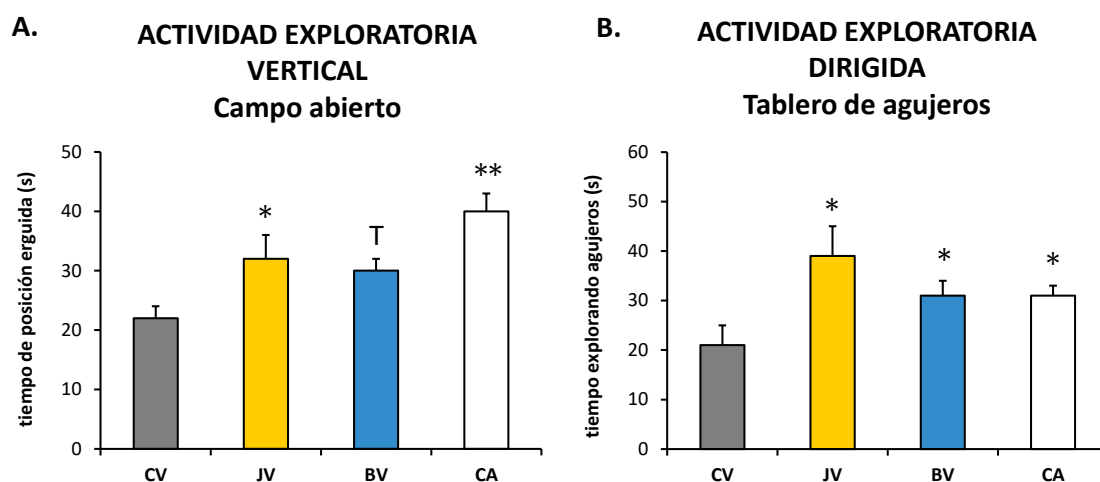
Los datos expresan la media ± error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CV. ◊◊◊p<0,001, ◊◊p<0,01 y ◊p<0,05 con respecto al valor obtenido en JV. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 en relación al valor en CA. EA: enriquecimiento ambiental, CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA.

un mayor número de erguimientos durante la prueba con respecto a los controles CV ( $p < 0,05$  en ambos parámetros), alcanzando valores similares a los observados en los adultos control CA. En cuanto a los parámetros analizados en el “campo abierto” y centrándose en la **actividad exploratoria horizontal no dirigida**, se observa que los ratones BV sometidos a hidroterapia mostraron una mayor deambulación total y media con respecto a los CV ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente), y también respecto a los JV ( $p < 0,001$  en ambos parámetros) e incluso a los CA ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente). Por su parte, los ratones JV deambularon menos por la zona externa del campo que los ratones viejos control CV ( $p < 0,05$ ). Además, ambos tipos de estrategia de EA produjeron un aumento de la deambulación interna en los ratones viejos (JV y BV) en comparación con los CV ( $p < 0,05$  en ambas comparaciones) y con los CA ( $p < 0,01$  en ambos casos). Además, los JV y BV mostraron mayor proporción de deambulación interna con respecto a la total en relación a la observada en los CV ( $p < 0,01$  para JV y  $p < 0,05$  para BV) y, de nuevo, similar a la de los CA (**Fig. 54A**). Respecto a la **actividad exploratoria vertical**, si bien todos los animales del estudio son capaces de adoptar la posición erguida al menos una vez a lo largo de la prueba, se observa que los animales viejos expuestos a EA mostraron un mayor número de erguimientos y permanecieron durante más tiempo (**Fig. 53A**) en esta posición que los CV y acercándose a los valores obtenidos en los controles de edad adulta CA, siendo estas diferencias significativas en el caso de los JV ( $p < 0,05$  para ambos parámetros) quedándose en tendencia significativa en el caso de los BV. Además, todos los JV se irguieron durante el primer minuto de la prueba, al igual que los CA y a diferencia de lo realizado por los BV ( $p < 0,001$ ) y los CV ( $p < 0,001$ ). No obstante, el EA con juguetes y la hidroterapia redujo el número de posiciones erguidas durante este primer minuto con respecto a lo observado en los CV ( $p < 0,05$  para ambas comparaciones) asemejándose al valor en los CA. En cuanto a las **respuestas de ansiedad** analizadas en el “campo abierto”, tanto los JV como los BV tardan menos tiempo en abandonar el punto de partida y más en alcanzar la periferia del campo en comparación con los controles viejos CV ( $p < 0,05$  en todos los casos), mostrando valores similares a los observados en los controles de edad adulta CA. Así mismo, cabría mencionar que es el EA con juguetes el que redujo el porcentaje de animales que realizan acicalamiento durante la prueba ( $p < 0,001$  con respecto a CV, BV y CA). Por su parte, la proporción de animales que defecan tanto de JV como de BV es menor en relación a la de los CV ( $p < 0,01$  en ambos casos) y similar a la obtenida en los CA.

Atendiendo a los parámetros conductuales determinados en el “tablero de agujeros” (**Tabla 23**), en relación a la **actividad exploratoria dirigida**, se observa que ambas estrategias parecen mejorar esta conducta en los individuos viejos. Así, si bien todos los animales del estudio exploran los agujeros del tablero al menos una vez y realizan un número de exploraciones similar (en el caso de los CV, JV y BV) durante el primer minuto de la prueba, los ratones viejos sometidos a EA tanto con juguetes como a hidroterapia tardaron menos tiempo en realizar la primera exploración en comparación con los controles viejos CV ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente), con valores similares a los observados en los controles de edad adulta CA. De forma similar a lo observado en los controles de edad adulta CA, los JV y los BV dedicaron más tiempo a explorar los agujeros con respecto a los CV ( $p < 0,05$  en ambos casos) (**Fig. 53B**) y dedicaron más segundos a explorar el agujero correspondiente en relación a los controles viejos (siendo sólo significativo en el caso de los JV, con un  $p < 0,01$  con respecto a los CV e incluso a los CA). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre los animales viejos expuestos a ambas estrategias de enriquecimiento y sus controles de igual edad cronológica (grupo CV) en cuanto al número de exploraciones en agujeros realizadas a lo largo del tiempo de duración de la prueba. Con respecto a la actividad exploratoria horizontal no dirigida o espontánea, los ratones JV mostraron menores deambulaciones total y externa en comparación con los CV ( $p < 0,01$  en ambos casos) y los CA ( $p < 0,001$  para los dos parámetros), no existiendo diferencias significativas entre los grupos del estudio en la deambulación media. Por su parte, tanto los JV como los BV deambularon por la zona interna del tablero en igual medida que los CV, aunque se observa que los BV presentaron una menor deambulación interna que los JV y los controles de edad adulta CA ( $p < 0,05$  en ambos casos). Con respecto a la actividad exploratoria vertical analizada en el “tablero de agujeros”, se observa una mejora generalizada de esta conducta en los animales viejos sometidos a las estrategias de EA. Así, durante el primer minuto de la prueba tanto los JV como los BV se irguieron más veces que los CV ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente) y tardaron menos tiempo en adoptar la primera posición erguida en comparación con los controles viejos (diferencia sólo significativa en el caso de los JV, con un  $p < 0,05$ ). Además, en ambos parámetros, los valores obtenidos en los JV y BV alcanzaron los observados en los controles adultos CA. Así mismo, a lo largo de toda la prueba y a diferencia de los CV, los ratones JV y BV realizaron un mayor número de erguimientos ( $p < 0,01$  en ambos casos) y dedicaron más tiempo a realizar esta conducta ( $p < 0,01$  en el caso de



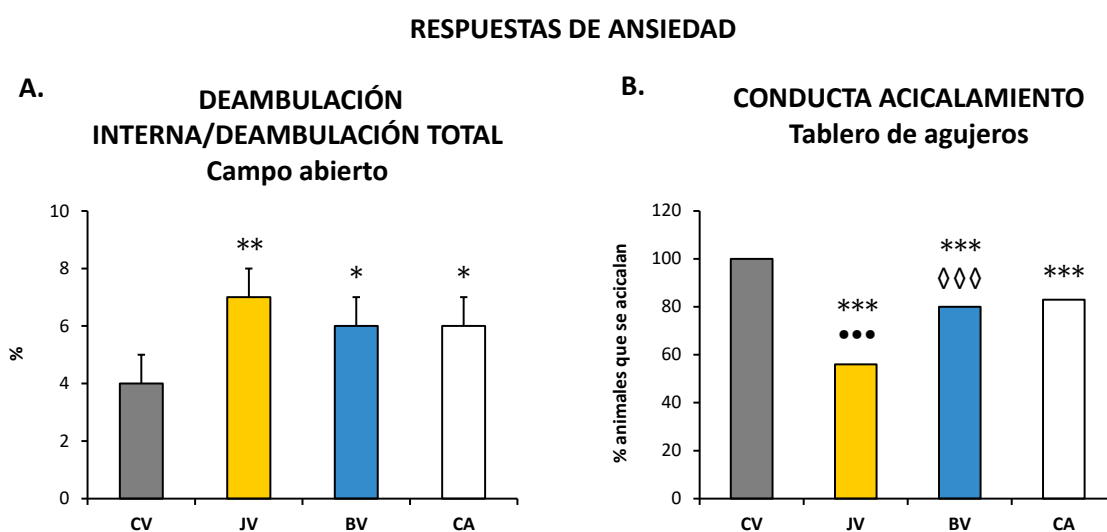
los JV y  $p < 0,001$  en los BV), asemejándose a lo realizado por los CA. Atendiendo a las **respuestas de ansiedad** evaluadas en esta prueba, cabe destacar que un menor porcentaje de los ratones JV y BV se acicalaron con respecto a los CV ( $p < 0,001$  en ambos casos) (**Fig. 54B**) así como realizaron un menor número de acicalamientos y dedicaron menos tiempo a esta conducta en comparación a dichos controles viejos, diferencia sólo significativa para los JV ( $p < 0,05$  para ambos parámetros). De forma similar, una menor proporción de animales sometidos a EA defecaron con respecto a los CV ( $p < 0,001$  en ambas comparaciones). No obstante, sólo se observa un aumento significativo de la proporción de deambulación interna en relación a la total en los ratones viejos expuestos a enriquecimiento con juguetes con respecto a los controles viejos CV ( $p < 0,01$ ).



**Figura 53. Actividad exploratoria vertical (tiempo dedicado a posiciones erguidas) en el “campo abierto” (A) y actividad exploratoria dirigida (tiempo explorando agujeros) en el “tablero de agujeros” (B) de ratones viejos ( $20 \pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  y T  $0,1 > p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, T: tendencia estadística.**

En cuanto a los resultados obtenidos del “laberinto T”, cabe destacar que los ratones JV, mostraron una mejor **actividad exploratoria vertical** de forma que un mayor porcentaje de estos animales se irguieron al menos una vez durante la prueba en relación a los CV ( $p < 0,05$ ) Así mismo, los JV realizaron un mayor número de erguimientos y dedicaron más tiempo a esta conducta que los CV ( $p < 0,01$  en ambos casos) e incluso que los CA ( $p < 0,01$  para ambos parámetros). Por su parte, también los ratones BV mostraron mejor

actividad vertical ya que tuvieron mayor número y tiempo de posición erguida que los controles viejos y adultos, si bien estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. En referencia a la **respuesta de ansiedad**, ningún animal del estudio realizó conducta de acicalamiento durante la prueba pero una menor proporción de animales BV defecaron con respecto a los CV ( $p<0,01$ ) y los JV ( $p<0,001$ ). No obstante, ninguna de las estrategias de EA indujo efecto alguno en la actividad exploratoria horizontal evaluada en el “laberinto T” en relación a los controles viejos.



**Figura 54. Respuestas de ansiedad: proporción de deambulación interna con respecto a la total en el “campo abierto” (A) y conducta de acicalamiento (%animales que se acicalan) en el “tablero de agujeros” (B) de ratones viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9\pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.** Cada barra representa la media $\pm$ error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. ◇◇◇ $p<0,001$  con respecto al valor obtenido en JV. ●●● $p<0,001$  con respecto al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA.

Las valoraciones funcionales realizadas en los leucocitos peritoneales en este estudio, se recogen en la **Tabla 24**. Atendiendo a las **funciones** analizadas de los **macrófagos** (**Tabla 24A**), se observa que ambos tipos de estrategias de EA indujeron una mejora generalizada de dichas funciones en los ratones viejos, acercándose a los valores de los controles de edad adulta CA. Así, los ratones JV y BV mostraron una mayor capacidad de **quimiotaxis** con respecto a los CV ( $p<0,001$  y  $p<0,05$  respectivamente), siendo este aumento más notable en los JV (**Fig. 55A**). Así mismo, también se observa una mejor **fagocitosis**, de manera que tanto los JV como los BV presentaron mayores índices ( $p<0,001$  en ambos casos) (**Fig. 55B**) y eficacia

## Resultados

Tabla 24. Funciones de macrófagos (A), de linfocitos y actividad citotóxica NK de leucocitos (B) peritoneales de ratones viejos (20±1 meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos (9±1 meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.

A.

Función macrófagos	CV	JV	BV	CA
Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)				
	146±15	324±32 ***	204±12 * ◇ ••	314±17 ***
Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)				
	148±11	279±8 *** •	299±16 *** •	240±13 ***
Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)				
	30±3	46±2 *** •	42±2 ** •	53±2 ***
Niveles intracelulares de anión superóxido (nmol/10 <sup>6</sup> células)				
Basales	33±6	26±5	19±4	21±5
Estimulados con látex	45±5	54±5	52±7	64±5 *

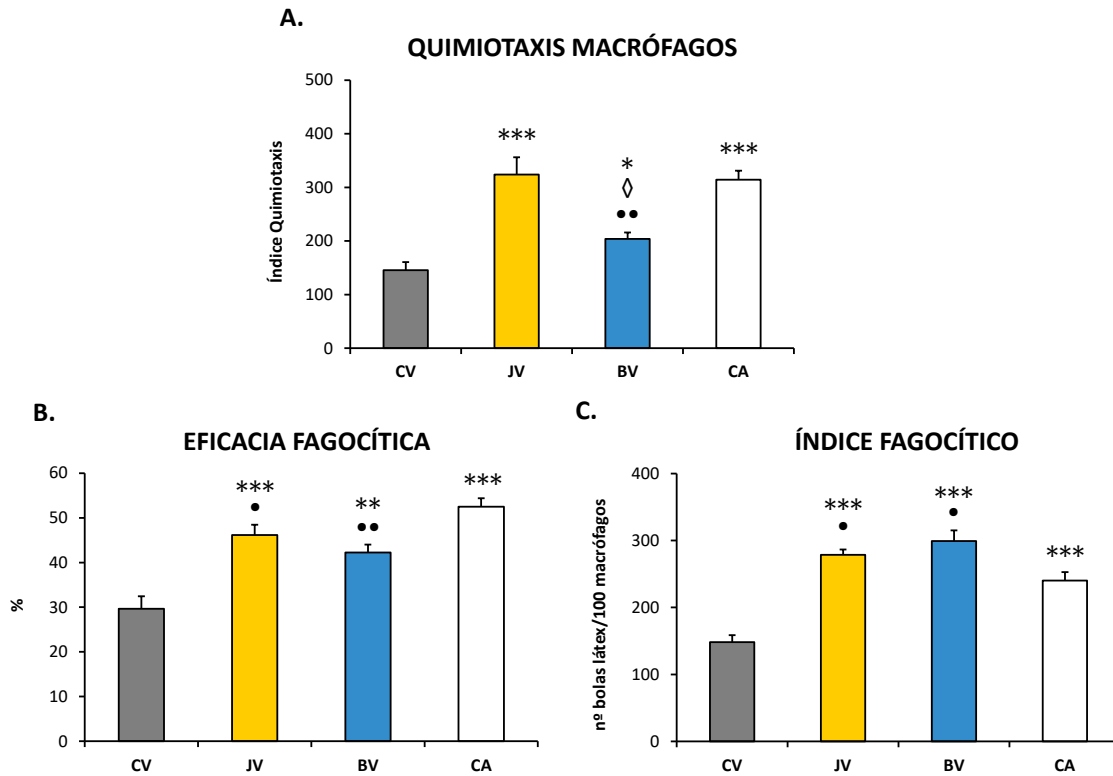
B.

Función linfocitos	CV	JV	BV	CA
Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)				
	210±17	516±33 *** ••	508±31 *** ••	864±94 ***
Proliferación (cuentas por minuto)				
En respuesta a LPS	945±22	1490±233 *	1256±131 T •	1627±91 ***
En respuesta a ConA	1045±35	2640±237 *** •••	2082±277 **	1476±115 **
Actividad <i>Natural killer</i>				
Actividad <i>Natural killer</i> (% lisis)				
	12±2	18±3 •	17±2 ••	28±1 ***

Los datos expresan la media ± error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 y T 0,1>p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CV. ◇p<0,05 con respecto al valor obtenido en JV. ••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 en relación al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, NK: *Natural killer*.

## Resultados

fagocíticos ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) (**Fig. 55C**) en relación a los controles viejos CV. Por su parte, no se obtuvieron diferencias significativas en los **niveles intracelulares de anión superóxido** producidos, ni en estado basal ni bajo condiciones de estimulación en presencia de látex, entre los animales expuestos a EA y los controles viejos.

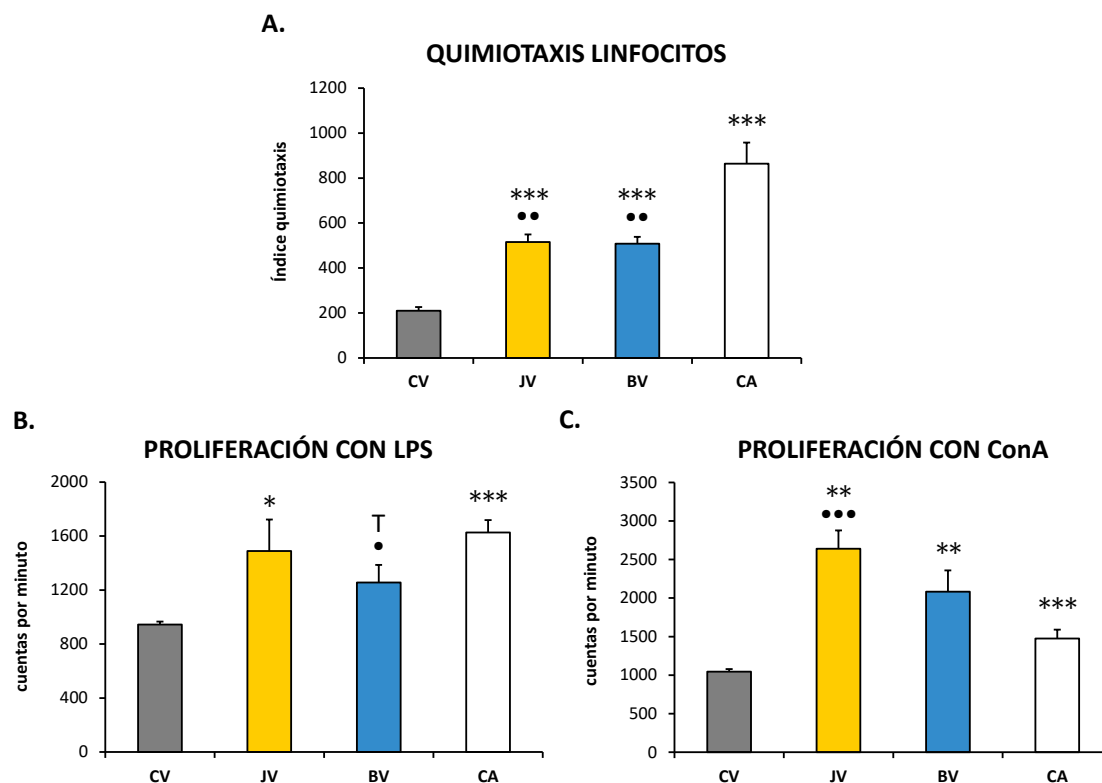


**Figura 55. Quimiotaxis (A) y eficacia (B) e índice (C) de fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratones viejos ( $20 \pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV.  $\diamond p < 0,05$  con respecto al valor obtenido en JV. •• $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA.

En referencia a los parámetros de **función de linfocitos** peritoneales evaluados (**Tabla 24B**), también ambas estrategias de EA indujeron una mejora de la actividad de estas células inmunitarias en los ratones viejos, asemejándose e incluso aventajando a los valores observados en los CA en algunos casos. Este hecho se apoya en que tanto los linfocitos de los ratones JV como los BV mostraron una mayor **quimiotaxis** que los de los CV ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 56A**). Así mismo, ambas estrategias de EA produjeron un aumento de la **capacidad de proliferación** de los linfocitos en condiciones de estimulación en

## Resultados

relación a los controles viejos CV, tanto en respuesta al **LPS** (sólo alcanzando la significación estadística en el caso de los JV con un  $p < 0,05$ , quedándose en tendencia para los BV) (**Fig. 56B**) como en presencia de **ConA** ( $p < 0,001$  para JV y  $p < 0,01$  para los BV) (**Fig. 56C**).



**Figura 56.** Quimiotaxis (A) y proliferación en respuesta a LPS (B) y ConA (C) de linfocitos peritoneales de ratones viejos ( $20 \pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  y T  $0,1 > p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. ••• $p < 0,001$ , •• $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, T: tendencia estadística.

En cuanto a la **actividad citotóxica NK** (**Tabla 24B**), si bien se observa los JV y BV mostraron valores mayores con respecto a los ratones CV, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Los resultados relativos a los parámetros de estrés oxidativo determinados en los leucocitos peritoneales se muestran en la **Tabla 25**. Como se puede observar, ambas estrategias de EA mejoran el estado redox de las células inmunitarias de los ratones viejos. De manera que tanto los ratones JV como los BV presentaron una menor **actividad XO** con respecto a los CV ( $p < 0,001$  en ambos casos) y similar

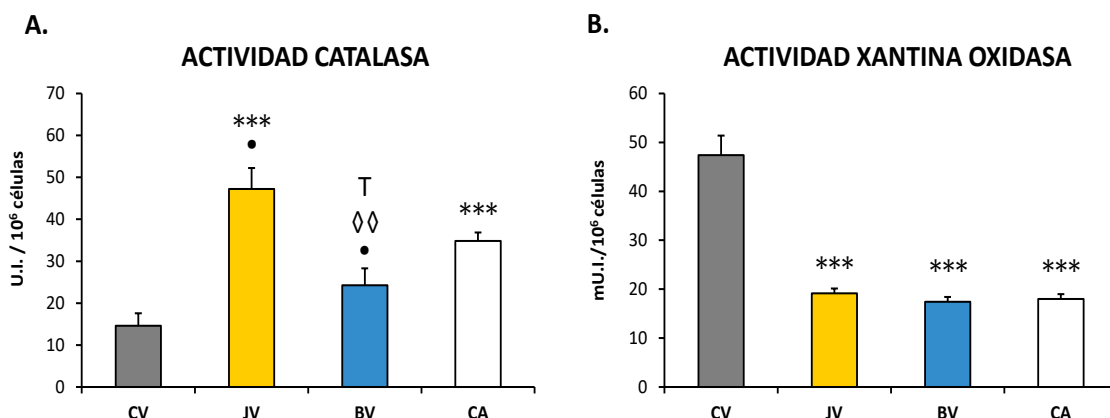
## Resultados

a la obtenida en los CA (**Fig. 57B**). Además, los leucocitos de los animales sometidos a EA también mostraron un aumento de la actividad de la enzima antioxidante **catalasa** en relación a la observada en los CV, siendo esta diferencia significativa en el caso de los JV ( $p<0,001$ ) y quedándose en tendencia estadística en los BV (**Fig. 57A**).

**Tabla 25. Parámetros de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9\pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.**

Parámetros estrés oxidativo	CV	JV	BV	CA
<b>Actividad XO (mU.I./<math>10^6</math> células)</b>				
	47 $\pm$ 4	19 $\pm$ 1 ***	17 $\pm$ 1 ***	18 $\pm$ 1 ***
<b>Actividad CAT (U.I./<math>10^6</math> células)</b>				
	15 $\pm$ 3	47 $\pm$ 5 *** •	24 $\pm$ 4 T ♦♦ •	35 $\pm$ 2 ***

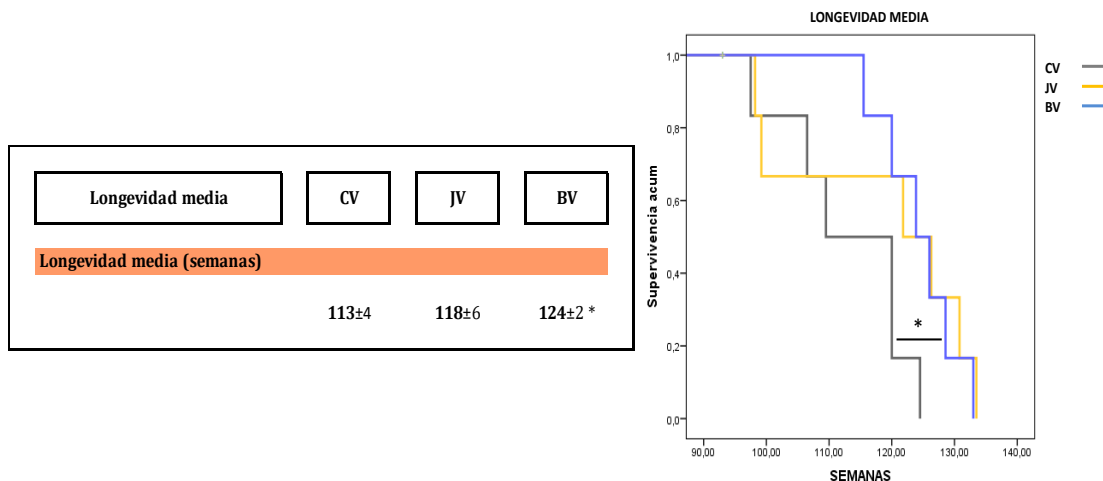
Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$  y  $T\ 0,1>p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. ♦♦ $p<0,01$  con respecto al valor obtenido en JV. • $p<0,05$  en relación al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, XO: xantina oxidasa, CAT: Catalasa, T: tendencia estadística.



**Figura 57. Actividad catalasa (A) y actividad xantina oxidasa (B) en leucocitos de ratones viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9\pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$  y  $T\ 0,1>p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. ♦♦ $p<0,01$  con respecto al valor obtenido en JV. • $p<0,05$  con respecto al valor en CA. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia, CA: ratones adultos controles no sometidos a EA, T: tendencia estadística.

Tras las valoraciones conductuales e inmunitarias, los ratones BV dejaron de someterse a hidroterapia mientras que el EA con juguetes se mantuvo en los JV. Se realizó el seguimiento individual tanto de los ratones viejos sometidos a ambas estrategias de EA como de los controles viejos CV, registrándose el momento de su muerte natural. Estos datos fueron utilizados para analizar los efectos de las estrategias sobre la **longevidad media** y se muestran en la **Fig. 58**. Así, se puede observar que el protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración, y no el EA con juguetes, fue suficiente para inducir un aumento de la longevidad media en los individuos viejos (BV) con respecto a la de los CV ( $p < 0,05$ ).

**Figura 58. Longevidad media (semanas) de ratones viejos ( $20 \pm 1$  meses de edad) expuestos a enriquecimiento ambiental con juguetes (grupo JV) o a hidroterapia (grupo BV) así como de ratones viejos (grupo CV) y adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad; grupo CA) estabulados sin enriquecimiento.**



Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 5-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CV. CV: ratones viejos controles no sometidos a EA, JV: ratones viejos expuestos a EA con juguetes, BV: ratones viejos sometidos a hidroterapia.

#### 4.4.2. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos de un protocolo de enriquecimiento ambiental con juguetes de 4 semanas de duración sobre la conducta de PAM adultos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de estos animales y sobre su longevidad media se muestran desde la **Tabla 26** a la **Tabla 28** y desde la **Figura 59** a la **Figura 65**.

Como se puede observar en la **Tabla 26**, el EA con juguetes indujo en los PAM una mejora general de sus **capacidades**



**sensoriomotoras** con respecto a los PAM estabulados en condiciones estándar y asemejándose a las presentadas por los NPAM. Así, ningún PAM-EA cayó de la “tabla de madera” ni de la “cuerda tirante” lo que indicaría que los PAM viviendo en un ambiente enriquecido presentaron mejor **equilibrio** y mayor **vigor muscular** (Fig. 59B), en relación a los PAM control ( $p<0,001$ ). Además en ambas pruebas también se observa un aumento de la **coordinación motora** en los PAM-EA, de manera que todos los individuos de este grupo fueron capaces de recorrer más de un segmento, tanto en la tabla como en la cuerda ( $p<0,001$  en ambos casos, con respecto a los PAM control), así como recorrieron un mayor número de segmentos durante el tiempo de duración de la prueba correspondiente ( $p<0,05$  en el caso de la “tabla de madera” y  $p<0,001$  en la “cuerda tirante” en relación a los PAM sin EA).

**Tabla 26. Capacidades sensoriomotoras de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos ( $9\pm 1$  meses de edad).**

	PAM	PAM EA	NPAM
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>			
<b>Tabla de Madera</b>			
Equilibrio (% animales que no caen)	90	100 ***	100 ***
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	90	100 ***	100 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	$3\pm 0,2$	$4\pm 0,6$ *	$4\pm 0,3$ **
Coordinación motora (% prueba completada)	87	100 ***	100 ***
<b>Cuerda tirante</b>			
Vigor muscular (% animales que no caen)	83	100 ***	100 ***
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	70	100 ***	100 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	$2\pm 0,08$	$3\pm 0,2$ ***	$3\pm 0,2$ ***
Coordinación motora (% prueba completada)	83	90 ***	100 ***
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	100	100	100

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental.

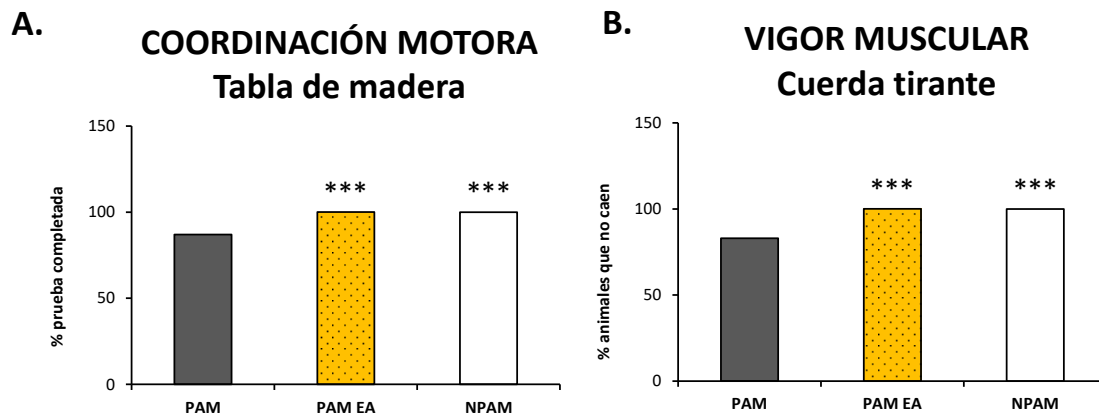
Adicionalmente, esta mejora de la coordinación motora observada en los PAM-EA se corrobora atendiendo al porcentaje de animales capaces de completar la “tabla de madera” y la “cuerda tirante”, de forma que todos los PAM-EA alcanzaron uno de los extremos de la tabla ( $p<0,001$ ) (Fig. 59A), a diferencia de lo observado en los PAM control. También, una mayor proporción de PAM-EA finalizó con éxito la “cuerda tirante” con respecto a los PAM estabulados en condiciones



estándar ( $p < 0,001$ ). En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de la **tracción** en la “cuerda tirante”, todos los individuos pertenecientes al estudio presentaron una prensilidad óptima (esto es, utilizaron las patas anteriores y posteriores así como su cola para asirse a la cuerda) por lo que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales en este parámetro.

Los resultados más relevantes obtenidos del “campo abierto”, del “tablero de agujeros” y del “laberinto T”, pruebas utilizadas para evaluar el **comportamiento exploratorio** y las **respuestas de ansiedad**, y que se recogen en la **Tabla 27** y en las **Figs. 60 y 61**, serán comentados seguidamente. De forma general los PAM-EA mostraron una mejor capacidad exploratoria, tanto horizontal no dirigida y dirigida como vertical, y una respuesta menos ansiosa en comparación con los PAM controles, asemejándose a los resultados obtenidos en los NPAM.

Atendiendo a los resultados extraídos del análisis conductual en el “campo abierto” (**Tabla 27**), se observa que los PAM-EA mostraron mayores **actividades exploratorias horizontal y vertical** con respecto a los controles PAM y similares a las mostradas por los NPAM.



**Figura 59.** Coordinación motora (% animales que completan la prueba) en la “tabla de madera” (A) y vigor muscular (% animales que no caen) en la “cuerda tirante” (B) de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad). Cada barra representa el % de animales que cumple el criterio analizado de 6-9 animales estudiados. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental.

## Resultados

**Tabla 27. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).**

	PAM	PAM EA	NPAM
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<b>Campo abierto</b>			
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Latencia en salir del punto de partida (s)	2±0,5	1±0,2 **	1±0,2 *
Deambulación total (DT)	248±25	312±20 *	328±20 *
Deambulación externa (DE)	153±18	165±9	180±16
Deambulación interna (DI)	95±8	148±15 **	148±5 ***
Cociente DI/DT (%)	39±1	47±2 **	46±2 *
<i>Actividad vertical</i>			
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	22±3	34±4 *	32±3 *
Tiempo de posición erguida (s)	24±4	38±5 *	41±4 **
% Animales que realizan erguimiento central	100	100	100
<i>Grooming</i>			
% Animales que realizan acicalamiento	100	100	100
Número total de acicalamientos	4±1	3±0,4	3±0,3
Tiempo de acicalamiento (s)	12±2	9±1	8±1
<i>Defecaciones y orina</i>			
% Animales que defecan	100	100	100
Número de bolas fecales	3±1	5±0,2 *	4±1
% Animales que orinan	0	0	0
<b>Tablero de agujeros</b>			
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Deambulación total (DT)	308±19	275±6	287±5
Deambulación externa (DE)	184±15	151±4 * ••	169±5
Deambulación interna (DI)	111±7	121±4	117±6
Cociente DI/DT (%)	38±1	45±2 ***	41±2
<i>Actividad vertical</i>			
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	27±3	31±4	34±3
Tiempo de posición erguida (s)	28±3	33±4	38±3 *
% Animales que realizan erguimiento central	100	100	100
<i>Actividad exploratoria dirigida</i>			
% Animales que exploran agujeros	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	8±1	13±2 ***	11±2 *
Tiempo total explorando agujeros (s)	13±2	30±6 *	27±2 ***
Latencia hasta explorar primer agujero (s)	26±4	17±2 *	18±4
<i>Grooming</i>			
% Animales que realizan acicalamiento	100	100	100
Número total de acicalamientos	2±0,4	1±0,2	1±0,2
Tiempo de acicalamiento (s)	8±1	4±0,4 **	5±1 *
<i>Defecaciones</i>			
% Animales que defecan	100	100	100
Número de bolas fecales	3±0,4	3±1	4±1
% Animales que orinan	14	0 ***	0 ***

Los datos expresan la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en PAM. ••p<0,01 con respecto al valor obtenido en NPAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental.

**Tabla 27 (cont.). Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).**

	PAM	PAM EA	NPAM
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<b>Laberinto T</b>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	40±6	29±4 T •	17±3 ***
<i>Actividad vertical</i>			
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100
Número total de erguimientos	1±0,4	5±1 **	3±1 *
Tiempo de posición erguida (s)	1±0,4	5±1 **	3±1 *
<i>Acicalamiento</i>			
% Animales que realizan acicalamiento	0	0	0
<i>Defecaciones</i>			
% Animales que defecan	0	0	0
% animales que orinan	0	0	0

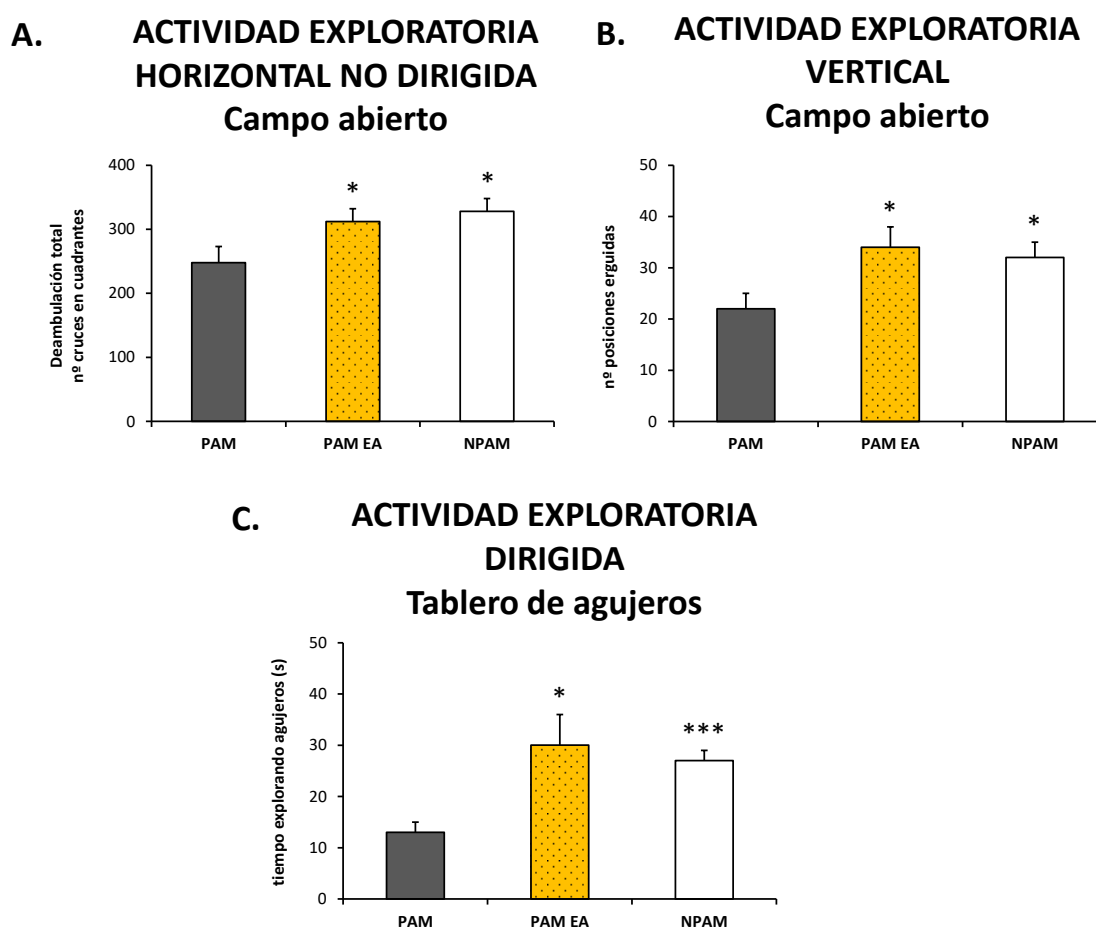
Los datos expresan la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 y T 0,05>p<0,1 con respecto al valor correspondiente en PAM. ••p<0,01 con respecto al valor obtenido en NPAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental.

En referencia a la actividad exploratoria horizontal, los PAM-EA presentaron mayores deambulaciones total (**Fig. 60A**) e interna en relación a los PAM (p<0,05 y p<0,01, respectivamente), no existiendo diferencias significativas en cuanto a la deambulación externa. En relación a la actividad exploratoria vertical, si bien todos los individuos del estudio fueron capaces de realizar erguimientos (incluyendo erguimientos de tipo central) durante la prueba, se observa que los PAM-EA se irguieron más veces (**Fig. 60B**) y durante más tiempo con respecto a los controles PAM (p<0,05 en ambos casos).

Atendiendo a las **respuestas de ansiedad** evaluadas en el “campo abierto”, los PAM-EA abordaron la prueba con menor ansiedad en comparación con los PAM y de forma similar a los NPAM, ya que tardaron menos tiempo en abandonar el punto de partida en el tablero (p<0,01) y mostraron una mayor proporción de deambulación en la zona interna del campo en relación a la total con respecto a los PAM

## Resultados

( $p < 0,01$ ) (**Fig. 61A**). Por su parte, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la conducta de acicalamiento entre los grupos de estudio, aunque se observa que los PAM-EA se acicalaron menos y dedicaron menos tiempo a esta conducta que los PAM y de forma similar a lo realizado por los NPAM. Finalmente, los PAM-EA presentaron un mayor número de bolas fecales con respecto a los PAM estabulados en condiciones estándar ( $p < 0,05$ ), no obstante todos los individuos del estudio mostraron similares conductas de defecación y urinaria en el “campo abierto”.

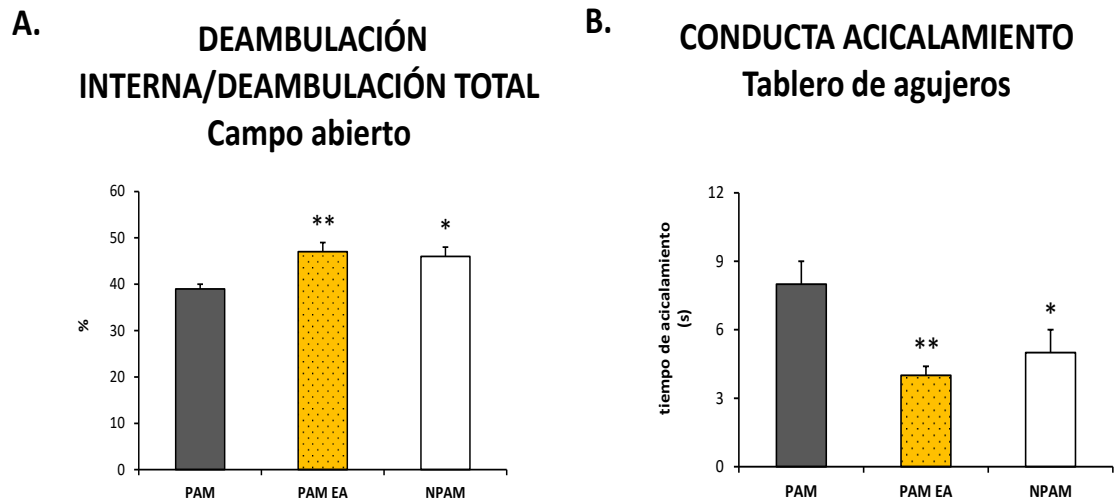


**Figura 60.** Actividades exploratorias horizontal no dirigida (deambulaci3n total) (A) y vertical (n3mero de posiciones erguidas) (B) en el “campo abierto” y actividad exploratoria dirigida (tiempo explorando agujeros) (C) en el “tablero de agujeros” de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) as3 como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad). Cada barra representa la media  $\pm$  error est3ndar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo n3mero de animales. \*\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental.

En relación a los resultados obtenidos en el “tablero de agujeros” (**Tabla 27**), prueba utilizada principalmente para evaluar la **actividad exploratoria de tipo dirigido**, se observa que los PAM-EA mostraron una mayor exploración dirigida además de respuestas menos ansiosas que los PAM controles y similares a las expuestas por los NPAM. Así, si bien todos los grupos experimentales exploraron los agujeros existentes en el tablero, los PAM-EA exploraron más veces los agujeros y dedicaron mayor tiempo a esa exploración (**Fig. 60C**) durante la prueba en comparación con los PAM estabulados en condiciones estándar ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Así mismo, los PAM-EA tardaron menos tiempo en explorar un agujero con respecto a los PAM ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las **respuestas de ansiedad** evaluadas en el “tablero de agujeros”, cabe destacar que los PAM-EA deambularon menor por la zona externa del tablero ( $p < 0,05$ ) y, de forma similar a lo observado en el “campo abierto”, mostraron una mayor proporción de deambulación interna con respecto a la deambulación total ( $p < 0,001$ ) en comparación con los PAM controles, asemejándose a los valores obtenidos en los NPAM en este último parámetro. Así mismo, los PAM-EA dedicaron menos tiempo a acicalarse (**Fig. 61B**) y no orinaron durante la prueba, a diferencia de lo observado en los PAM estabulados en condiciones estándar ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  respectivamente). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los PAM-EA y los PAM controles en el resto de parámetros analizados en el “tablero de agujeros”.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el “laberinto T” (**Tabla 27**), se observa que los PAM-EA presentaron una mayor **actividad vertical** de manera que realizaron un mayor número de erguimientos y dedicaron más tiempo a esta conducta con respecto a los PAM controles ( $p < 0,01$  en ambos casos). Además, los PAM-EA requirieron de menos tiempo para explorar el laberinto en su totalidad, lo que indicaría una mejor **eficacia exploratoria** en comparación con la mostrada por los PAM que vivían en condiciones estándar, si bien esta diferencia sólo alcanzó tendencia en la significación estadística. Además, y como ocurre a lo largo del presente estudio conductual, los valores de los parámetros analizados en el “laberinto T” obtenidos en los PAM-EA se asemejaron, en general, a los obtenidos en los NPAM.

RESPUESTAS DE ANSIEDAD



**Figura 61.** Proporción deambulaci3n interna con respecto a la total (A) en el campo abierto y conducta de acicalamiento (tiempo de acicalamiento) (B) en el tablero de agujeros de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) as3 como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad). Cada barra representa la media ± error est3ndar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo n3mero de animales. \*\*\*p<0,001 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental.

Los resultados obtenidos a partir de las valoraciones funcionales en los leucocitos peritoneales se muestran en la **Tabla 28** as3 como en las **Figs. 62 y 63**.

Respecto a las **funciones** analizadas en los **macr3fagos** peritoneales (**Tabla 28A**), se observa que los PAM-EA presentaron un mayor 3ndice de **quimiotaxis** en comparaci3n a los PAM controles (p<0,001) (**Fig. 62A**). De igual manera, los macr3fagos de los PAM-EA mejoraron su capacidad de **fagocitosis**, presentando un mayor 3ndice fagoc3tico y una mayor eficacia fagoc3tica (**Fig. 62B**) que los PAM controles (p<0,01 y p<0,05, respectivamente). Adem3s, estos par3metros analizados en los macr3fagos de los PAM-EA alcanzan valores similares a los obtenidos en los NPAM, con excepci3n del 3ndice de fagocitosis.

## Resultados

Tabla 28. Funciones de macrófagos (A), de linfocitos y actividad citotóxica NK de leucocitos (B) peritoneales de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).

A.

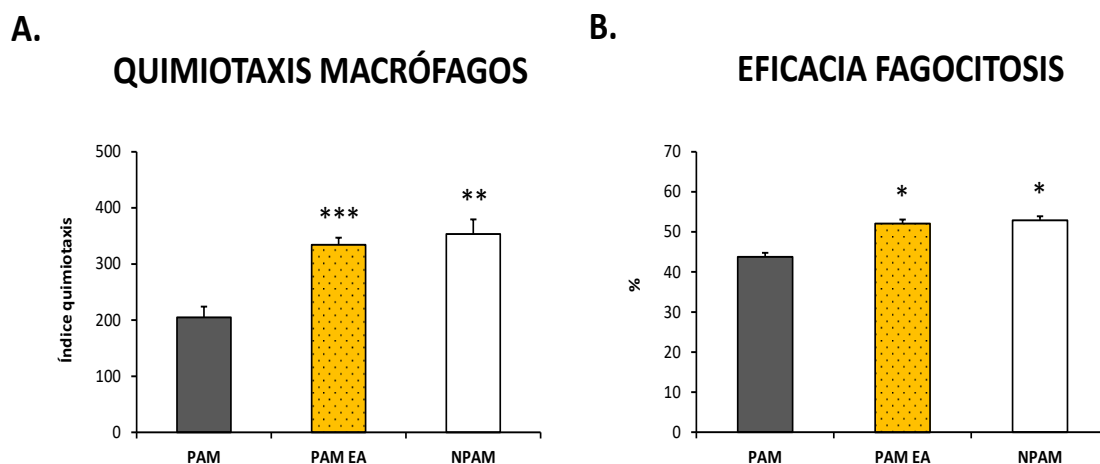
Función macrófagos	PAM	PAM EA	NPAM
Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)			
	205±19	334±13 ***	353±26 **
Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)			
	253±14	351±19 ** ••	444±19 ***
Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)			
	44±3	52±2 *	53±2 *

B.

Función linfocitos	PAM	PAM EA	NPAM
Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)			
	648±30	847±49 *	985±47 ***
Proliferación (cuentas por minuto)			
En respuesta a LPS	2230±237	1818±211 ••	3431±348 *
En respuesta a ConA	1342±342	2640±91 **	2594±164 **
Concentración de IL2 (pg/mL) secretada en presencia de ConA			
	50±6	153±14 ***	87±17 *
Actividad <i>Natural killer</i>			
Actividad <i>Natural killer</i> (% lisis)			
	19±2	46±6 ***	39±3 ***

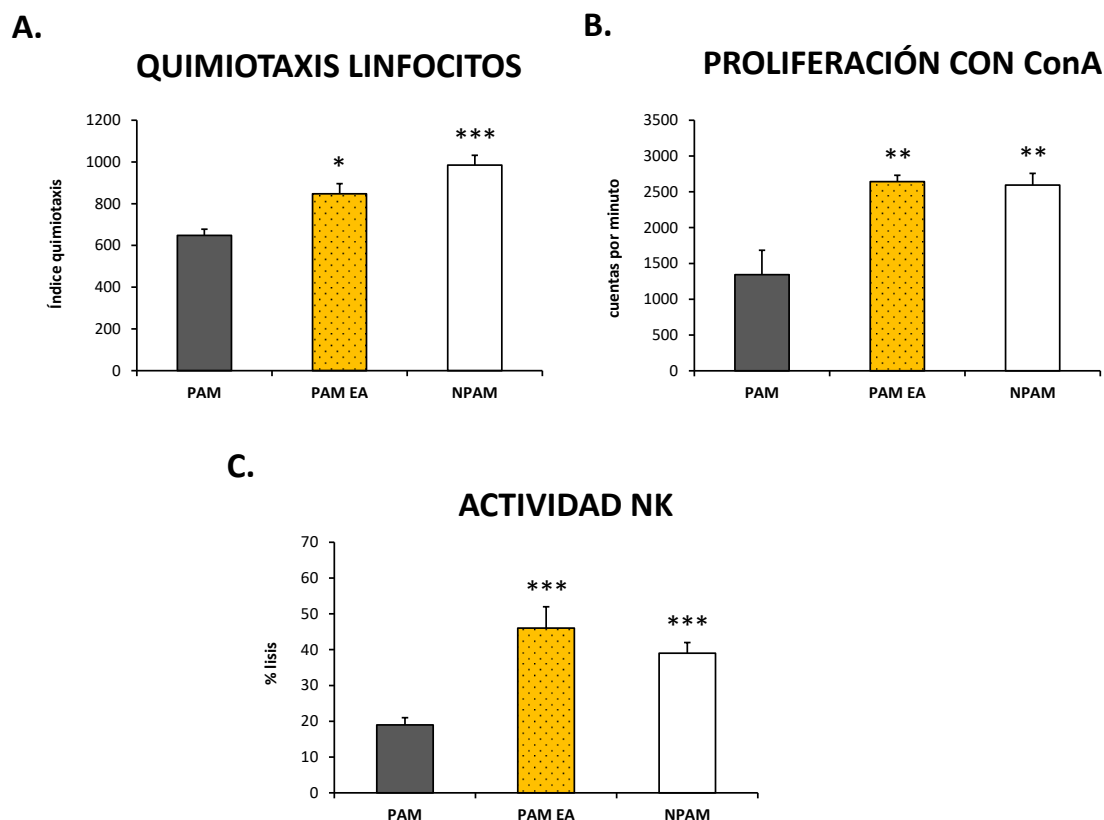
Los datos expresan la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en PAM. ••p<0,01 con respecto al valor obtenido en NPAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, NK: *Natural killer*.

Atendiendo a las **funciones** analizadas en los **linfocitos** así como la actividad citotóxica NK de los leucocitos peritoneales (**Tabla 28B**), se observa que los linfocitos de los PAM-EA mostraron una mayor capacidad de **quimiotaxis** ( $p<0,05$ ) (**Fig. 63A**) y una mayor **proliferación en respuesta a la ConA** ( $p<0,01$ ) (**Fig. 63B**) con respecto a los PAM controles y alcanzando valores similares a los obtenidos en los NPAM. Además, los leucocitos de los PAM-EA en cultivo en presencia de ConA, secretaron una mayor cantidad de **IL2** con respecto a los PAM ( $p<0,001$ ), alcanzando un valor similar al mostrado por los NPAM. No obstante, el EA parece no ejercer ningún efecto significativo sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos al **LPS** en los PAM. Por su parte, vivir en un ambiente enriquecido con juguetes indujo en los PAM un notable aumento de la **actividad citotóxica NK** (**Fig. 63C**) en comparación con la mostrada por los PAM controles ( $p<0,001$ ) y similar a la obtenida en los NPAM.



**Figura 62. Quimiotaxis (A) y eficacia fagocítica (B) de macrófagos peritoneales de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).** Cada barra representa la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental.

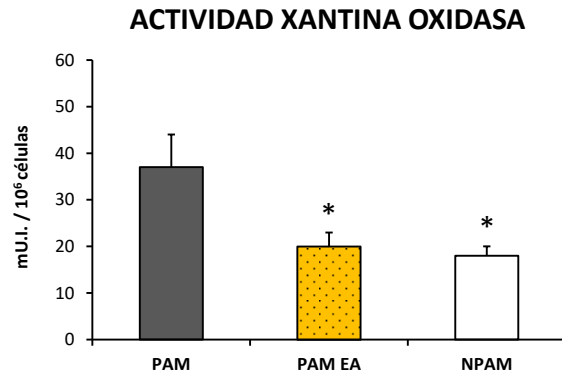




**Figura 63.** Quimiotaxis (A), respuesta proliferativa a la ConA (B) y actividad citotóxica NK (C) de leucocitos peritoneales de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (proliferación y actividad NK). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental, ConA: Concanavalina A, NK: *Natural killer*.

En lo referente a los parámetros de estrés oxidativo, como se puede observar en la **Fig. 64**, los leucocitos de los PAM-EA mostraron una menor actividad **XO** con respecto a los PAM estabulados en condiciones estándar ( $p < 0,05$ ), alcanzando una actividad enzimática similar a la presentada por los ratones NPAM. Esto podría indicar que el EA con juguetes parece revertir el mayor estrés oxidativo característico en los ratones prematuramente envejecidos.

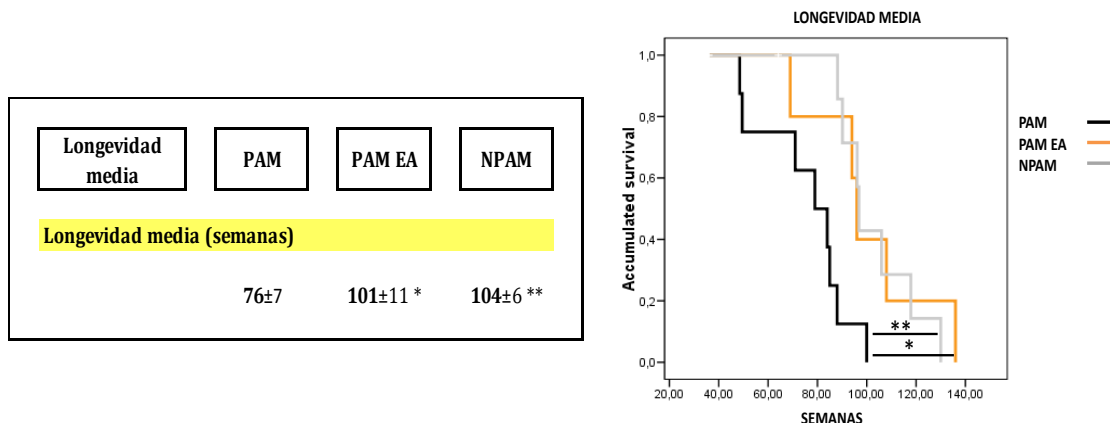
## Resultados



**Figura 64. Actividad Xantina oxidasa (XO) en leucocitos peritoneales de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).** Cada barra representa la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no envejecidos prematuramente, EA: enriquecimiento ambiental.

Una vez realizadas las valoraciones conductuales y de función y estrés oxidativo de los leucocitos, el EA se mantuvo en los PAM-EA y los PAM y NPAM continuaron estabulados en condiciones estándar. Los resultados del análisis de la **longevidad media** (Fig. 65) indican que vivir en un ambiente enriquecido con juguetes produjo en los PAM un aumento de su longevidad ( $p < 0,05$ ) con respecto a los PAM no sometidos a enriquecimiento, alcanzando una esperanza de vida similar a la mostrada por los NPAM.

**Figura 65. Longevidad media (semanas) de PAM expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes durante 4 semanas (grupo PAM EA) así como de PAM y NPAM controles, estabulados sin enriquecimiento ambiental (grupos PAM y NPAM) adultos (9±1 meses de edad).**



Los datos expresan la media ± error estándar de 6-9 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en PAM. PAM: *Prematurely Aging Mice* o ratones prematuramente envejecidos, NPAM: *Non Prematurely Aging Mice* o ratones no prematuramente envejecidos, EA: enriquecimiento ambiental.

#### 4.4.3. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.

En las **Tablas 29 y 30** así como en las **Figuras 66 y 67** se muestran los resultados referentes al estudio de los efectos de un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración sobre los niveles de ansiedad, la función y el estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones viejos aislados durante 4 semanas, así como los efectos sobre la longevidad de estos animales.

Como se puede observar en la **Tabla 29**, tras haber recibido el protocolo de hidroterapia los ratones viejos aislados permanecieron más tiempo (expresado en porcentaje) en los brazos abiertos del aparato con respecto al tiempo mostrado antes de la estrategia ( $p < 0,01$ ), lo que indicaría que la hidroterapia redujo los **niveles de ansiedad** de los animales aislados.

**Tabla 29. Niveles de ansiedad (% de tiempo en brazos abiertos) en el “laberinto en cruz elevado” de ratones viejos ( $18 \pm 1$  meses de edad) aislados durante 4 semanas, antes y después de un protocolo de hidroterapia (“baño”) de 4 semanas de duración.**

Laberinto en cruz elevado	ANTES DEL BAÑO	DESPUÉS DEL BAÑO
Tiempo en brazos abiertos (%)		
	22 $\pm$ 3	42 $\pm$ 5 ##

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 5-8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. ## $p < 0,01$  con respecto al valor correspondiente antes del baño.

Los resultados obtenidos de las valoraciones inmunológicas en los leucocitos peritoneales se recogen en la **Tabla 30**. En relación a las funciones de **macrófagos** analizadas (**Tabla 30A**), la hidroterapia no ejerció efecto alguno sobre la **quimiotaxis** y los **índice y eficacia fagocíticos** en los ratones viejos aislados. No obstante, la hidroterapia sí ejerció un efecto positivo sobre la funcionalidad de los **linfocitos** peritoneales (**Tabla 30B**). Así, los linfocitos de los ratones viejos aislados tras el baño mostraron una mayor **capacidad quimiotáctica** con respecto a los ratones aislados ( $p < 0,01$ ) e incluso con respecto a los ratones viejos que vivían en grupo ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 66A**). Así mismo, la hidroterapia produjo una menor **proliferación basal** ( $p < 0,001$ ) que en los linfocitos de los ratones aislados viejos y mayores respuestas

## Resultados

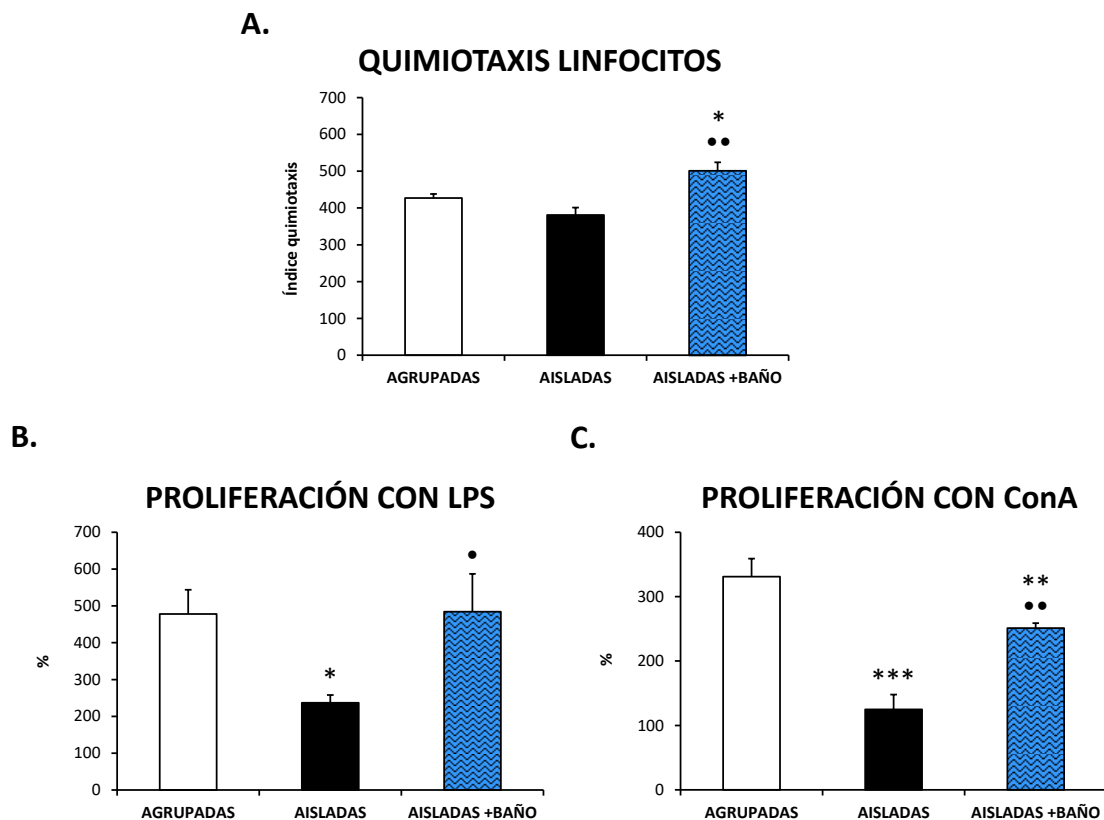
**Tabla 30. Funciones de macrófagos (A) y funciones de linfocitos y actividad citotóxica NK de ratones viejos (18±1 meses de edad) aislados durante 4 semanas tras haber recibido un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración (grupo AISLADAS+BAÑO), así como de ratones viejos (18±1 meses de edad) aislados (4 semanas de aislamiento) (grupo AISLADAS) y estabulados en grupo (AGRUPADOS).**

<b>A.</b>			
Función macrófagos	AGRUPADAS	AISLADAS	AISLADAS+BAÑO
<b>Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)</b>			
	371±24	223±16 ***	246±25 **
<b>Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)</b>			
	333±22	349±18	370±15
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>			
	54±2	56±2	57±1
<b>B.</b>			
Función linfocitos	AGRUPADAS	AISLADAS	AISLADAS+BAÑO
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>			
	427±11	381±20	501±23 * **
<b>Proliferación</b>			
Basal (cuentas por minuto)	2183±627	3073±177	1310±88 ***
Capacidad de estimulación LPS (%)	478±66	237±21 *	484±103 •
Capacidad de estimulación ConA (%)	331±28	125±23 ***	251±8 ** **
<b>Actividad <i>Natural killer</i></b>			
<b>Actividad <i>Natural killer</i> (% lisis)</b>			
	26±1	21±3	25±1

Los datos expresan la media ± error estándar de 5-8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por duplicado (quimiotaxis y fagocitosis) o triplicado (proliferación y actividad NK). \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en AGRUPADAS. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor en AISLADAS. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

proliferativas al **LPS** ( $p<0,05$ ) (**Fig. 66B**) y a la **ConA** ( $p<0,01$ ) (**Fig. 66C**) alcanzándose valores semejantes a los observados en los ratones viejos agrupados (con excepción de la proliferación en presencia de la ConA que siguió siendo menor que en los agrupados,  $p>0,01$ ).

Por su parte, la hidroterapia no ejerció efecto alguno sobre la **actividad citotóxica NK** de los leucocitos peritoneales de los ratones viejos aislados, no obteniéndose ninguna diferencia significativa entre los tres grupos experimentales.



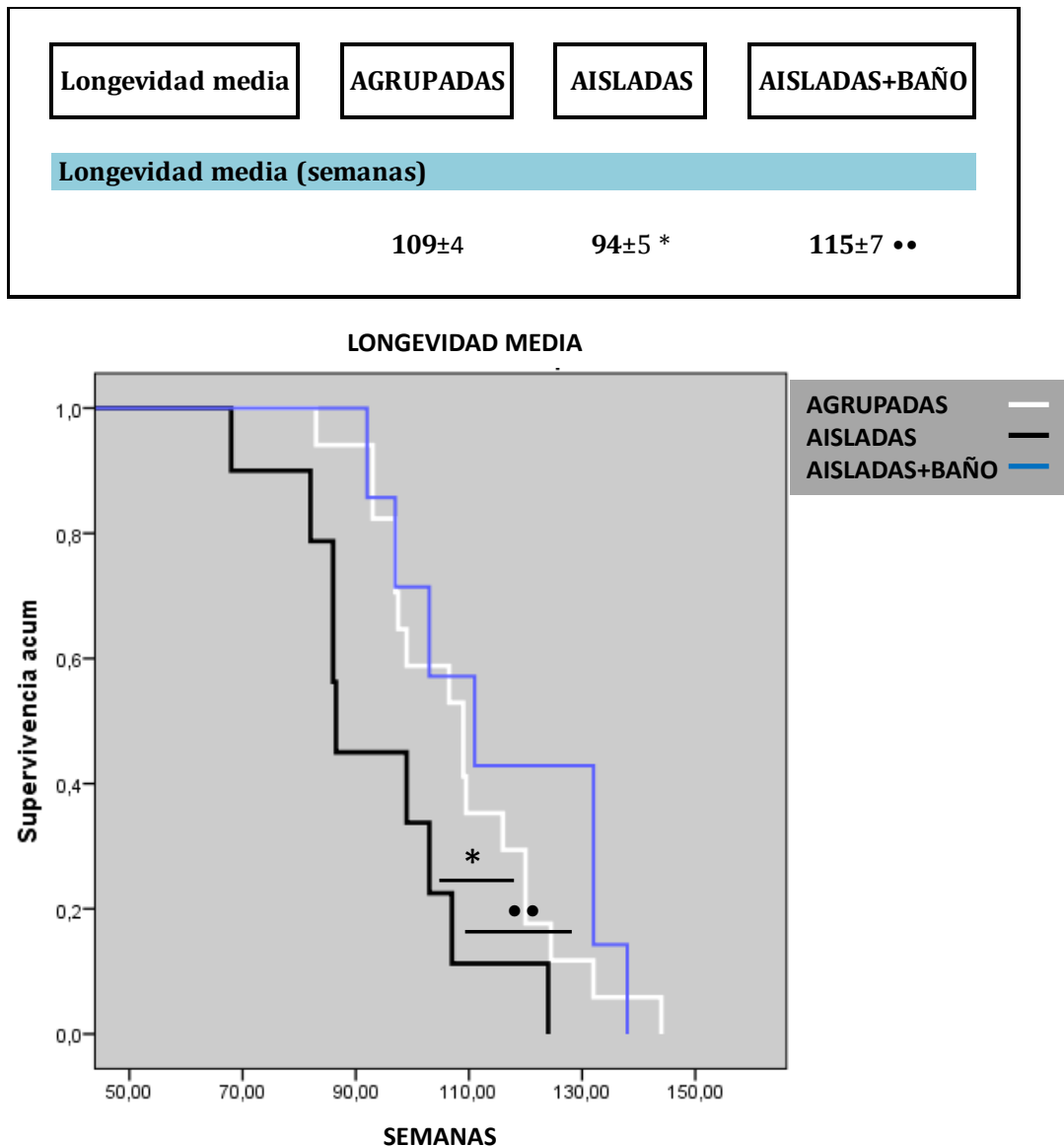
**Figura 66.** Quimiotaxis (A) y respuesta proliferativa al LPS (B) y a la ConA (C) de linfocitos peritoneales ratones viejos ( $18\pm 1$  meses de edad) aislados durante 4 semanas tras haber recibido un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración (grupo AISLADAS+BAÑO), así como de ratones viejos ( $18\pm 1$  meses de edad) aislados (4 semanas de aislamiento) (grupo AISLADAS) y estabulados en grupo (grupo AGRUPADAS). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (proliferación). \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en AGRUPADAS. •• $p<0,01$  y • $p<0,05$  con respecto al valor en AISLADAS. LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

Una vez finalizadas las valoraciones inmunológicas, los ratones viejos aislados permanecieron en aislamiento social y no volvieron a recibir hidroterapia hasta su muerte natural. El análisis de los resultados de la **longevidad** media de los todos los individuos del

## Resultados

estudio (**Fig. 67**) muestra que los ratones aislados que se sometieron al protocolo de hidroterapia durante 4 semanas en la vejez vivieron más que los animales aislados que no recibieron dicho tratamiento, presentando una longevidad media similar a la de los individuos estabulados en grupo durante toda su vida.

**Figura 67. Longevidad media (semanas) de ratones viejos ( $18 \pm 1$  meses de edad) aislados durante 4 semanas tras haber recibido un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración (grupo AISLADAS+BAÑO), así como de ratones viejos ( $18 \pm 1$  meses de edad) aislados (4 semanas de aislamiento) (grupo AISLADAS) y estabulados en grupo (AGRUPADAS).**



Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 5-8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en AGRUPADAS. •• $p < 0,01$  con respecto al valor en AISLADAS.

#### 4.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre parámetros conductuales y de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos de un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros de 2 semanas de duración sobre la conducta de ratones ICR-CD1 maduros ( $12 \pm 1$  meses de edad) y viejos ( $20 \pm 1$  meses de edad), así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de estos animales, se muestran desde la **Tabla 31** hasta la **Tabla 36** y desde la **Figura 68** hasta la **Figura 71**.

Los posibles efectos de la hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre las capacidades sensoriomotoras en los animales maduros se recogen en la **Tabla 31** y en la **Tabla 32** para animales viejos.

**Tabla 31. Capacidades sensoriomotoras de ratones maduros ( $12 \pm 1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	MADUROS		
	CC	CB	SB
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>			
<i>Reflejo visual</i>			
% animales que presentan respuesta	100	100	100
<i>Reflejo de Extensión Posterior</i>			
% animales que presentan respuesta	100	100	100
<i>Cuerda tirante</i>			
Vigor muscular (% animales que no caen)	50	33 *	75 *** ••
Vigor muscular (latencia de caída, s)	$10 \pm 1$	$30 \pm 2$ ***	$51 \pm 4$ *** •
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	50	50	83 *** ••
Coordinación motora (segmentos recorridos)	$1 \pm 0,4$	$1 \pm 0,5$	$2 \pm 0,3$
Coordinación motora (% prueba completada)	10	17	50 *** ••
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	40	50	92 *** ••

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CC. •• $p < 0,001$ , • $p < 0,01$  y • $p < 0,05$  con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

## Resultados

Con respecto a las **capacidades sensoriomotoras** evaluadas en los ratones **maduros** (Tabla 31), todos los individuos del estudio presentaron respuestas positivas para los **reflejos** visual y extensor posterior. Observando los resultados obtenidos de la “cuerda tirante” (Tabla 31), se puede decir que los ratones SB fueron los que experimentaron una notable mejoría de las capacidades sensoriomotoras analizadas en esta prueba, entre los grupos de estudio. Así, los SB que cayeron de la cuerda (en un porcentaje menor al obtenido en los ratones controles CC y a los CB), tardaron más tiempo en hacerlo con respecto a los ratones CC ( $p<0,001$ ) y a los ratones CB ( $p<0,05$ ), lo que apuntaría a un mayor **vigor muscular**.

**Tabla 32. Capacidades sensoriomotoras de ratones viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	VIEJOS		
	CC	CB	SB
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>			
<i>Reflejo visual</i>			
% animales que presentan respuesta	88	100 ***	100 ***
<i>Reflejo de Extensión Posterior</i>			
% animales que presentan respuesta	75	69	72
<i>Cuerda tirante</i>			
Vigor muscular (% animales que no caen)	25	62 ***	22 ••
Vigor muscular (latencia de caída, s)	13 $\pm$ 6	19 $\pm$ 5	19 $\pm$ 6
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	38	69 ***	71 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Coordinación motora (% prueba completada)	13	54 ***	43 ***
Tracción (% animales con prensilidad óptima)	13	92 ***	64 *** ••

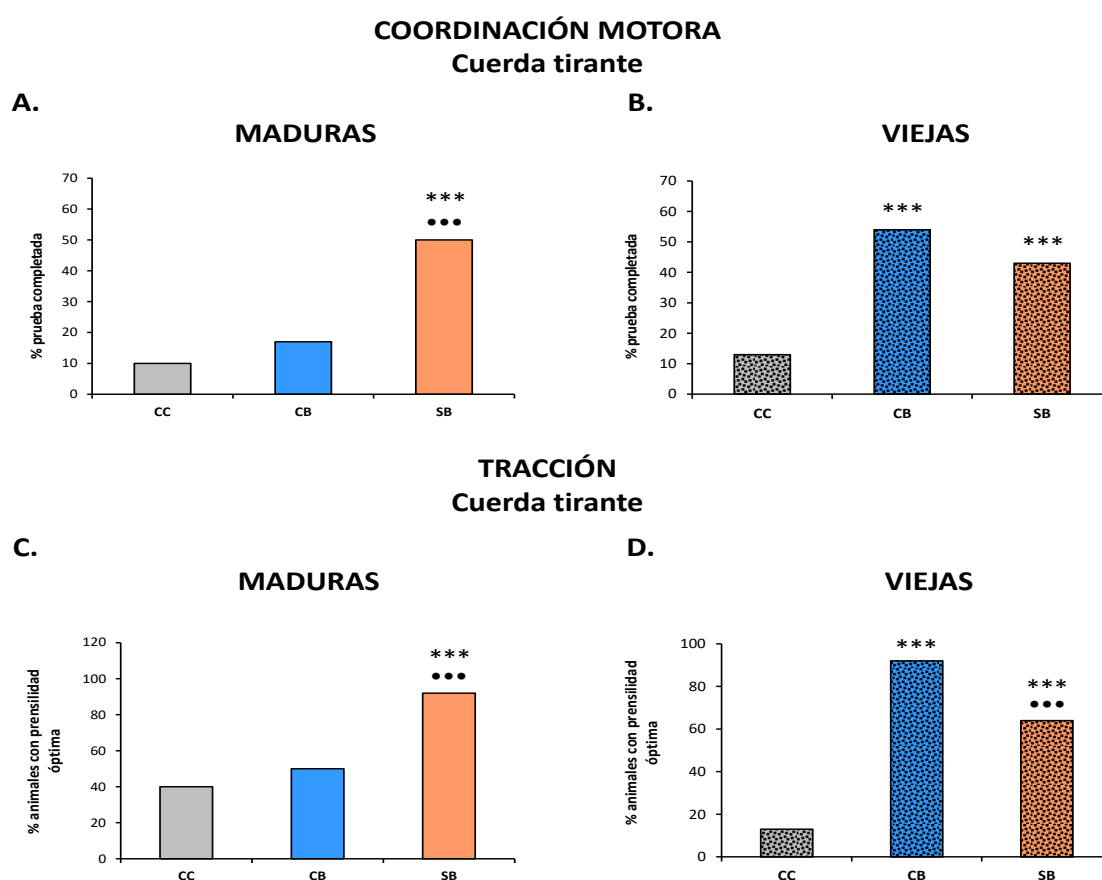
Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 7-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p<0,001$ , y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en CC. •• $p<0,001$  con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

Además, los SB también mostraron una mejor **coordinación motora** con respecto a los CC y a los CB, de manera que una mayor proporción de animales SB fueron capaces de recorrer más de un segmento de la cuerda en relación con los CC y los CB ( $p<0,001$  para ambos casos). Así mismo, un mayor porcentaje de individuos SB



## Resultados

consiguieron terminar exitosamente la prueba, alcanzando uno de los extremos de la cuerda, con respecto a los ratones CC y los CB ( $p<0,001$  en ambas comparaciones) (**Fig. 68A**). De igual forma, la hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros indujo un efecto positivo en la **tracción** de los animales maduros de forma que una mayor proporción de ratones SB mostraron una prensilidad óptima en comparación con los ratones CC ( $p<0,001$ ) e incluso en relación a los ratones CB ( $p<0,001$ ) (**Fig. 68C**). Además, los animales CB cayeron menos en esta prueba y, aquellos que sí cayeron, lo hicieron más tardíamente en comparación con los animales CC ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ , respectivamente), indicando un mayor vigor muscular que el mostrado por los ratones CC.



**Figura 68. Capacidades sensoriomotoras de ratones maduros ( $12\pm1$  meses de edad) y viejos ( $20\pm1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupos SB) o con agua corriente (grupos CB) así como de ratones maduros y viejos estabulados en condiciones estándar (grupos CC): coordinación motora (% animales que completan la prueba) en maduros (A) y viejos (B) y tracción (% animales con prensilidad óptima) en maduros (C) y viejos (D) en la “cuerda tirante”. Cada barra representa el % de animales que presentan la conducta correspondiente de 6-10 individuos. \*\*\* $p<0,001$  con respecto al valor correspondiente en CC. ••• $p<0,001$  con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.**

Atendiendo a los resultados del análisis de las **capacidades sensoriomotoras** realizado en ratones **viejos** (**Tabla 32**), se puede observar que tanto los ratones viejos sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) como con agua corriente (grupo CB) presentaron una respuesta positiva en el **reflejo** visual en comparación con los ratones viejos estabulados en condiciones estándar (grupo CC) ( $p < 0,001$  en ambos casos). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos de estudio referente al reflejo extensor posterior.

Con respecto a los resultados obtenidos en la “cuerda tirante” (**Tabla 32**), los animales viejos SB realizaron la prueba con una mejor **coordinación motora** de forma que un mayor porcentaje de esos ratones recorrió más de un segmento de la cuerda y fue capaz de completar con éxito la misma en relación a los controles viejos CC ( $p < 0,001$  para ambos parámetros). Así mismo, una mayor proporción de viejos SB mostraron una prensilidad óptima, utilizando sus patas anteriores y posteriores y su cola para asirse a la cuerda, con respecto a los CC ( $p < 0,001$ ), indicando que la hidroterapia con agua mineralo-medicinal indujo una mejora en la **tracción** de los animales (**Fig. 68D**). Por otro lado, los ratones viejos sometidos al protocolo de hidroterapia con agua corriente (grupo CB) son los que mostraron una mejora generalizada de sus capacidades sensoriomotoras en la “cuerda tirante”. Así, un mayor porcentaje de CB no cayeron de la cuerda en comparación con los CC e incluso con los SB ( $p < 0,001$  en ambos casos), siendo indicativo de un mayor **vigor muscular**. Además los CB mostraron una mejor coordinación motora ya que una mayor proporción de estos animales recorrieron más de un segmento de la cuerda y fueron capaces de completar la prueba con éxito con respecto a los CC ( $p < 0,001$  para ambas comparaciones). Además, un mayor porcentaje de animales viejos CB presentaron una prensilidad óptima con respecto a los CC ( $p < 0,001$ ) e incluso en relación con los SB ( $p < 0,001$ ), siendo el grupo experimental que mostró la mejor tracción en la “cuerda tirante” (**Fig. 68D**).

## Resultados

**Tabla 33. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones maduros (12±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	MADUROS		
	CC	CB	SB
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<b>Test de esquinas</b>			
Número de esquinas visitadas	8±1	8±0,5	7±1
% animales que presentan posición erguida	10	100 ***	100 ***
Número total de posiciones erguidas	3±1	5±1 *	5±1 *
<b>Campo abierto</b>			
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>			
<b>Actividad horizontal</b>			
Latencia en salir del punto de partida (s)	8±2	4±1 *	3±1 *
Latencia en alcanzar la periferia (s)	19±4	7±1 **	7±1 **
Deambulación total (DT)	286±68	472±38 **	435±26 **
Deambulación externa (DE)	167±15	277±21 ***	279±18 ***
Deambulación interna (DI)	119±25	196±22 *	156±12
Cociente DI/DT (%)	21	42 **	36 **
<b>Actividad vertical</b>			
% animales que presentan posición erguida	60	100 ***	100 ***
Número total de posiciones erguidas	11±1	21±3 **	30±3 ***
% animales que realizan erguimiento central	50	42	67 ** ...
<b>Acicalamiento</b>			
% animales que realizan acicalamiento	100	83 ***	83 ***
Número total de acicalamientos	1±0,2	2±1	2±1
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>			
% animales que defecan	100	100	83 *** ...
Número de bolas fecales	3±0,5	3±0,5	3±1
% animales que orinan	40	33	25 *
<b>Tablero de agujeros</b>			
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>			
<b>Actividad horizontal</b>			
Deambulación total (DT)	293±38	322±24	322±15
<b>Actividad vertical</b>			
% animales que presentan posición erguida	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	12±4	21±4	27±2 **
<b>Actividad exploratoria dirigida</b>			
% animales que exploran agujeros	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	11±1	17±2	14±1 *
<b>Acicalamiento</b>			
% animales que realizan acicalamiento	100	100	100
Número total de acicalamientos	2±0,5	2±0,5	2±0,5
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>			
% animales que defecan	90	83	83
Número de bolas fecales	2±1	2±0,4	2±0,5
% animales que orinan	0	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. ...p<0,001 y •p<0,05 con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

## Resultados

**Tabla 33 (cont.). Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones maduros (12±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	MADUROS		
	CC	CB	SB
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<b>Laberinto T</b>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Tiempo de cruce intersección (s)	7±1	5±1	3±0,5 **
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	37±14	26±8 *	23±13 *
<i>Actividad vertical</i>			
% animales que presentan posición erguida	90	67 ***	58 ***
Número total de posiciones erguidas	2±1	1±0,4	1±0,5
<i>Acicalamiento</i>			
% animales que realizan acicalamiento	0	0	0
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>			
% animales que defecan	60	17 ***	17 ***
Número de bolas fecales	2±1	1±0,2	1±0,1
% animales que orinan	0	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. •••p<0,001 y •p<0,05 con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

Los resultados obtenidos del estudio del comportamiento exploratorio y las respuestas de ansiedad en el protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros se muestran en las **Tablas 33** y **34**, para los ratones maduros y viejos, respectivamente.

Como se puede observar en la **Tabla 33**, en la “prueba de las esquinas” todos los **ratones maduros** tanto sometidos a hidroterapia, tanto con aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuros (SB) como con agua corriente (CB) fueron capaces de erguirse con respecto a los ratones controles CC (p<0,001, para ambos casos). Así mismo, los SB y los CB realizaron más erguimientos que los CC (p<0,05 en ambas comparaciones). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos del estudio en relación al número de esquinas visitadas durante la duración de la prueba.

Con respecto a los resultados obtenidos en el “campo abierto” (**Tabla 33**), se puede observar que los maduros SB mostraron una mejor capacidad de exploración y menores respuestas de ansiedad. Así,

en relación a la **actividad exploratoria horizontal no dirigida**, los ratones SB mostraron mayores deambulaciones total y externa con respecto a los CC ( $p<0,01$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Si bien también se observa un aumento de la deambulación interna en los SB en comparación con los CC, esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

En referencia a la **actividad exploratoria de tipo vertical**, todos los ratones maduros SB fueron capaces de adoptar posición erguida con respecto a los CC, y realizaron un mayor número de erguimientos (**Fig. 69A**) ( $p<0,001$  en ambos parámetros). Además, una mayor proporción de los SB realizaron erguimiento de tipo central en relación a los CC maduros ( $p<0,01$ ). En lo referente a las **respuestas de ansiedad** evaluadas en el “campo abierto”, puede decirse que los ratones maduros SB mostraron una respuesta menos ansiosa que los CC durante la realización de la prueba, de manera que los SB tardaron menos tiempo en abandonar el punto de partida y alcanzaron antes la periferia que los ratones CC ( $p<0,05$  y  $p<0,01$ , respectivamente). Además, los SB mostraron una mayor proporción de deambulación por la zona interna del campo con respecto a la deambulación total que los CC ( $p<0,01$ ) y un menor porcentaje de ratones SB maduros realizaron acicalamiento con respecto a los controles CC de igual edad cronológica ( $p<0,001$ ) (**Fig. 70A**). De forma similar, la hidroterapia con agua rica en sulfuros también influyó en las conductas de defecación y urinaria de los ratones maduros de manera que una menor proporción de individuos SB orinó en relación al grupo CC ( $p<0,05$ ) y defecó respecto a los CC e incluso a los CB ( $p<0,001$  en ambos casos). En cuanto a los resultados obtenidos en los ratones maduros con la hidroterapia con agua corriente (CB) se observa que la misma también ejerció un efecto positivo sobre la conducta exploratoria y las respuestas de ansiedad en el campo abierto. Así, los CB muestran mayores deambulaciones total, externa e interna con respecto a los CC ( $p<0,01$ ,  $p<0,001$  y  $p<0,05$  respectivamente). De forma similar, los ratones CB también muestran una mejor actividad exploratoria vertical, todos ellos irguiéndose al menos una vez durante la prueba, a diferencia de lo observado en los CC ( $p<0,001$ ), y realizaron mayor número de erguimientos que los CC ( $p<0,01$ ). Finalmente, si bien menos generalizado pero semejante a lo observado en los ratones SB, los individuos CB mostraron una respuesta menos ansiosa al realizar el “campo abierto”, tardando menos tiempo en abandonar el punto de partida ( $p<0,05$ ) y alcanzar la periferia del tablero ( $p<0,01$ ), y mostrando una mayor proporción de deambulación interna con

## Resultados

**Tabla 34. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	VIEJOS		
	CC	CB	SB
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<i>Test de esquinas</i>			
Número de esquinas visitadas	6±4	8±3	6±2
% animales que presentan posición erguida	50	93 ***	86 ***
Número total de posiciones erguidas	1±1	5±3 **	5±3 **
<i>Campo abierto</i>			
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Latencia en salir del punto de partida (s)	1±1	0,5±0,5	1±1
Latencia en alcanzar la periferia (s)	8±5	4±2 **	6±4
Deambulación total (DT)	202±33	356±40 **	367±58 *
Deambulación externa (DE)	122±19	219±25 **	214±28 **
Deambulación interna (DI)	80±23	136±24	153±31 *
Cociente DI/DT (%)	40	38	42
<i>Actividad vertical</i>			
% animales que presentan posición erguida	100	100	86 *** ••
Número total de posiciones erguidas	5±3	19±5 *	13±5 *
% animales que realizan erguimiento central	25	54 ***	36 •
<i>Acicalamiento</i>			
% animales que realizan acicalamiento	100	100	86 *** ••
Número total de acicalamientos	3±1	3±1	4±1
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>			
% animales que defecan	63	85 ***	79 *
Número de bolas fecales	2±1	3±1	2±0,4
% animales que orinan	25	14	21
<i>Tablero de agujeros</i>			
<i>Actividad exploratoria no dirigida</i>			
<i>Actividad horizontal</i>			
Deambulación total (DT)	236±27	309±16	297±37
<i>Actividad vertical</i>			
% animales que presentan posición erguida	63	100 ***	90 *** •
Número total de posiciones erguidas	7±3	21±4 **	18±4 *
<i>Actividad exploratoria dirigida</i>			
% animales que exploran agujeros	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	11±2	14±1	11±2
<i>Acicalamiento</i>			
% animales que realizan acicalamiento	75	86	93 ***
Número total de acicalamientos	1±1	2±1	2±2
<i>Conductas de defecación y urinaria</i>			
% animales que defecan	100	61 ***	50 ***
Número de bolas fecales	3±0,4	1±0,4 *	1±0,5 *
% animales que orinan	0	15 ***	0 •••

Los datos expresan la media ± error estándar de 7-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. •••p<0,001 y •p<0,05 con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

**Tabla 34 (cont.). Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

VIEJOS			
	CC	CB	SB
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>			
<b>Laberinto T</b>			
<b>Actividad horizontal</b>			
Tiempo de cruce intersección (s)	10±3	8±1	7±3
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	74±11	25±2 *	36±12 *
<b>Actividad vertical</b>			
% animales que presentan posición erguida	38	39	36
Número total de posiciones erguidas	1±1	1±1	1±1
<b>Acicalamiento</b>			
% animales que realizan acicalamiento	13	0 ***	7 •
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>			
% animales que defecan	0	7 *	0
Número de bolas fecales	0	1±0,3 *	0
% animales que orinan	0	0	0

Los datos expresan la media ± error estándar de 7-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. •p<0,05 con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

respecto a la total (p<0,01) que los CC. Además, un menor porcentaje de animales pertenecientes al grupo CB presentaron conducta de acicalamiento con respecto a los CC (p<0,001). Atendiendo a los resultados del “tablero de agujeros” (**Tabla 33**), cabe destacar que los ratones maduros SB presentaron un ligero aumento del número de exploraciones en los agujeros del tablero con respecto a los controles CC (p<0,05), lo que indicaría cierta mejoría de la conducta de **exploración de tipo dirigido**. Así mismo, los ratones SB tuvieron de nuevo mejor conducta exploratoria vertical de forma que mostraron mayor número de posiciones erguidas que los CC (p<0,01). No se obtuvieron diferencias significativas en los restantes parámetros analizados entre los ratones SB y los CC. Por el contrario, la hidroterapia con agua corriente no pareció ejercer efecto alguno sobre los parámetros evaluados en el “tablero de agujeros” ya que los ratones CB mostraron similares conductas que los CC. Referente a los resultados obtenidos del “laberinto T” (**Tabla 33**), cabe destacar que el protocolo de hidroterapia tanto con agua mineralo-medicinal rica en

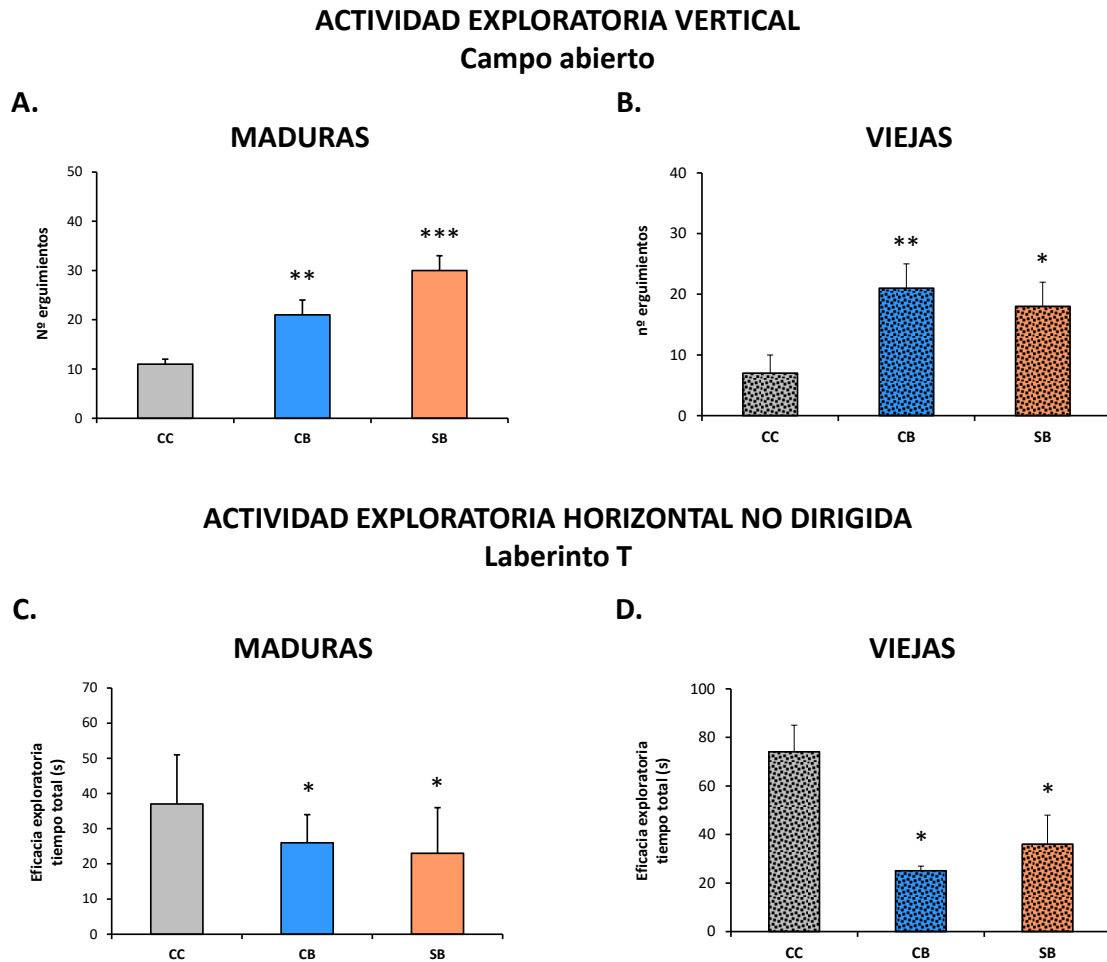
sulfuros como con agua corriente indujo en los ratones maduros una mejora de su actividad exploratoria horizontal en relación a la de los ratones control CC. Así, los ratones SB y CB maduros tardaron menos tiempo en explorar el laberinto en su totalidad en comparación con los CC ( $p < 0,05$  en ambos casos) (**Fig. 69C**). Además, el hecho de que los ratones sometidos a hidroterapia tardaran menos tiempo en cruzar la intersección entre los brazos del aparato que los ratones CC (siendo esta diferencia significativa en el caso de los SB ( $p < 0,01$ ) y que una menor proporción de ratones SB y CB defecaran durante la prueba en relación a los controles ( $p < 0,001$  para ambas comparaciones) podría apuntar que estos individuos mostraron una respuesta menos ansiosa al laberinto.

Los resultados relativos a la capacidad exploratoria y las respuestas de ansiedad de los ratones **viejos** sometidos a un protocolo de hidroterapia con aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuros o con agua corriente así como de ratones no sometidos a dicho protocolo de igual edad cronológica, se muestran en la **Tabla 34**. Como se puede observar, en la “prueba de esquinas”, un mayor porcentaje tanto de los ratones SB como de los CB viejos se irguieron al menos una vez durante la prueba con respecto al porcentaje obtenido en los CC ( $p < 0,001$ ). Consecuentemente, los ratones viejos sometidos a hidroterapia, independientemente del tipo de agua utilizada, mostraron un aumento del número de posiciones erguidas con respecto a las realizadas por los CC ( $p < 0,01$  para ambos casos). No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al número de esquinas visitadas entre los tres grupos experimentales. En relación a los resultados obtenidos en el “campo abierto” (**Tabla 34**), se observa que los ratones SB viejos muestran una mayor **capacidad exploratoria horizontal no dirigida** de manera que estos animales presentaron mayores deambulaciones total, externa e interna con respecto a los CC ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente). La hidroterapia con aguas mineralo-medicinales también pareció mejorar la **actividad exploratoria vertical** en el “campo abierto” en los animales viejos. Así, si bien un menor porcentaje de ratones SB se irguieron durante la prueba ( $p < 0,001$  con respecto a los CC), estos animales realizaron un mayor número de erguimientos con respecto a los CC ( $p < 0,05$ ). Atendiendo a las **respuestas de ansiedad** analizadas en el “campo abierto”, cabe destacar que una menor proporción de ratones viejos SB realizaron acicalamiento en comparación con los ratones CC ( $p < 0,001$ ) e incluso con respecto a los individuos CB ( $p < 0,001$ ), lo que podría



## Resultados

indicar que estos ratones muestran una respuesta menos ansiosa ante la prueba.

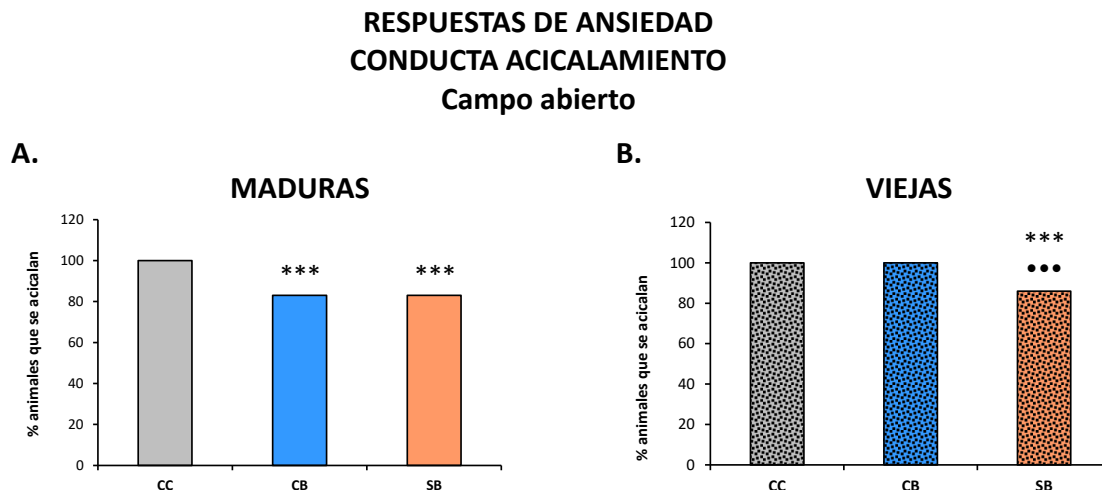


**Figura 69. Actividad exploratoria no dirigida de ratones maduros (12±1 meses de edad) y viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupos SB) o con agua corriente (grupos CB) así como de ratones maduros y viejos estabulados en condiciones estándar (grupos CC): actividad vertical (número de erguimientos) de maduros (A) y viejos (B) en el “campo abierto” y actividad exploratoria horizontal no dirigida (tiempo en explorar el laberinto en su totalidad) de maduros (C) y viejos (D) en el “laberinto T”.** Cada barra representa la media ± error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en CC. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

En cuanto a los efectos de la hidroterapia con agua corriente (grupo CB), esta estrategia mejoró la exploración tanto horizontal como vertical de manera que los individuos viejos CB presentaron mayores deambulaciones total y externa ( $p < 0,01$ ) y un mayor número de erguimientos ( $p < 0,05$ ) con respecto a los CC, con valores similares a los observados en los ratones SB. Además, los individuos CB tardaron menos tiempo en alcanzar la periferia del campo desde el punto de

partida ( $p<0,01$ ) y una mayor proporción de ellos realizaron erguimiento de tipo central ( $p<0,001$ ) en comparación con los CC, parámetros que podrían apoyar la mejora en la capacidad de exploración inducida también por esta hidroterapia.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el “tablero de agujeros” (**Tabla 34**), si bien en los SB y CB no parece observarse efectos sobre las **actividades exploratorias horizontales no dirigida y dirigida**, sí se aprecia una mejora en la **exploración de tipo vertical**. Así, un mayor porcentaje de ratones SB viejos se irguieron y, consecuentemente, adoptaron un mayor número de posiciones erguidas con respecto a los controles CC ( $p<0,001$  y  $p<0,05$  respectivamente). Así mismo, todos los individuos CB adoptaron posición erguida y realizaron un mayor número de erguimientos que los CC ( $p<0,001$  y  $p<0,01$  respectivamente).



**Figura 70.** Respuestas de ansiedad en el campo abierto de ratones maduros ( $12\pm 1$  meses de edad) y viejos ( $20\pm 1$  meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupos SB) o con agua corriente (grupos CB) así como de ratones maduros y viejos estabulados en condiciones estándar (grupos CC): conducta de acicalamiento (% de animales que realizaron acicalamiento) de maduros (A) y viejos (B). Cada barra representa el % de animales que realizan el parámetro, de 6-10 individuos. \*\*\* $p<0,001$  con respecto al valor correspondiente en CC. ••• $p<0,001$  con respecto al valor en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

En cuanto a las **respuestas de ansiedad** evaluadas en el “tablero de agujeros”, se observa que un menor porcentaje de animales SB defecan con respecto a los individuos CC ( $p<0,001$ ) y, consecuentemente, estos ratones SB presentaron un menor número de bolas fecales que los CC ( $p<0,05$ ). De forma similar, una menor proporción de los ratones CB defecaron y presentaron menor número

de bolas fecales que los controles viejos CC ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$  respectivamente). Ambos parámetros podrían indicar que los ratones viejos SB y CB podrían tener una respuesta menos ansiosa al enfrentarse al “tablero de agujeros”. No obstante, el porcentaje de ratones CB y SB que realizan acicalamiento fue un poco mayor que el observado en los ratones CC (llegando a ser significativo en el caso de los SB ( $p < 0,001$ ) y que una proporción ligeramente mayor de individuos viejos CB orinaron durante la realización de la prueba ( $p < 0,001$  con respecto a los CC y los SB).

Como se puede observar en los resultados obtenidos en el “laberinto T” (**Tabla 34**), el protocolo de hidroterapia tanto con agua mineralo-medicinal como con agua corriente indujo un aumento de la **capacidad exploratoria horizontal**, de forma que los ratones viejos SB y CB tardaron menos tiempo en explorar por completo el laberinto con respecto a los controles viejos CC ( $p < 0,05$  en ambos casos) (**Fig. 69D**). No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la actividad vertical entre los grupos de estudio. Por su parte, un menor porcentaje de ratones SB y de los CB se acicalaron durante la prueba con respecto a los CC, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso de los CB ( $p < 0,001$ ). Este hecho podría indicar, de nuevo, que la hidroterapia podría reducir la **ansiedad** de los animales viejos al realizar el “laberinto T”.

Los parámetros de función y de estrés oxidativo valorados en los leucocitos peritoneales de los ratones maduros y viejos del presente estudio se recogen en las **Tablas 35 y 36** y en la **Figura 71**.

En relación al estudio realizado en los individuos **maduros** (**Tabla 35**), se observa que si bien la hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros indujo un aumento de la **actividad citotóxica NK** en los animales SB con respecto a los controles CC, esta diferencia no alcanzó la significación estadística. No obstante, los animales CB sí que mostraron un aumento notable de la actividad NK en comparación con los animales CC ( $p < 0,005$ ) (**Fig. 71A**). En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo evaluados en los leucocitos, cabe destacar que ni en los SB ni en los CB no se apreció efecto alguno ni sobre la capacidad de producir **ROS** en condiciones de estimulación (con PMA y látex) de dichas células ni en las concentraciones intracelulares de **GT** (**Fig. 71C**), no existiendo diferencias significativas en estos parámetros entre los ratones SB y CB y los CC maduros.

Atendiendo a las valoraciones inmunitarias y de estrés oxidativo realizadas en los leucocitos peritoneales de los animales **viejos** (Tabla 36), se observa que la hidroterapia utilizando aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuros indujo una mejora de la capacidad de **fagocitosis** de los **macrófagos** peritoneales, de manera que los ratones viejos SB presentaron un mayor índice fagocítico con respecto a los ratones viejos CC ( $p<0,01$ ) e incluso en relación al mostrado por los ratones viejos CB ( $p<0,05$ ). Las diferencias en la eficacia de fagocitosis no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Por su parte, la **actividad citotóxica NK** aumenta en igual grado tanto en los ratones viejos SB como en los CB con respecto a los controles CC de igual edad cronológica ( $p<0,05$ ) (Fig. 71B), por lo que la hidroterapia mejoró este parámetro inmunitario independientemente de la naturaleza del agua utilizada.

**Tabla 35. Parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales de ratones maduros (12±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	CC	CB	SB
<b>Parámetros inmunitarios</b>			
<b>Actividad NK (% lisis)</b>			
	18±3	33±7 *	24±6
<b>Parámetros estrés oxidativo</b>			
<b>Capacidad de estimulación de producción de ROS (%)</b>			
En presencia de PMA	130±12	149±21	120±9
En presencia de Látex	143±17	170±26	142±13
<b>Concentraciones intracelulares de glutatión total (nmol GT/10<sup>6</sup> células)</b>			
	2±0,5	1±0,1	2±0,1

Los datos expresan la media ± error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado en la actividad NK y la producción de ROS. \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en CC. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, NK: *Natural killer*, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.

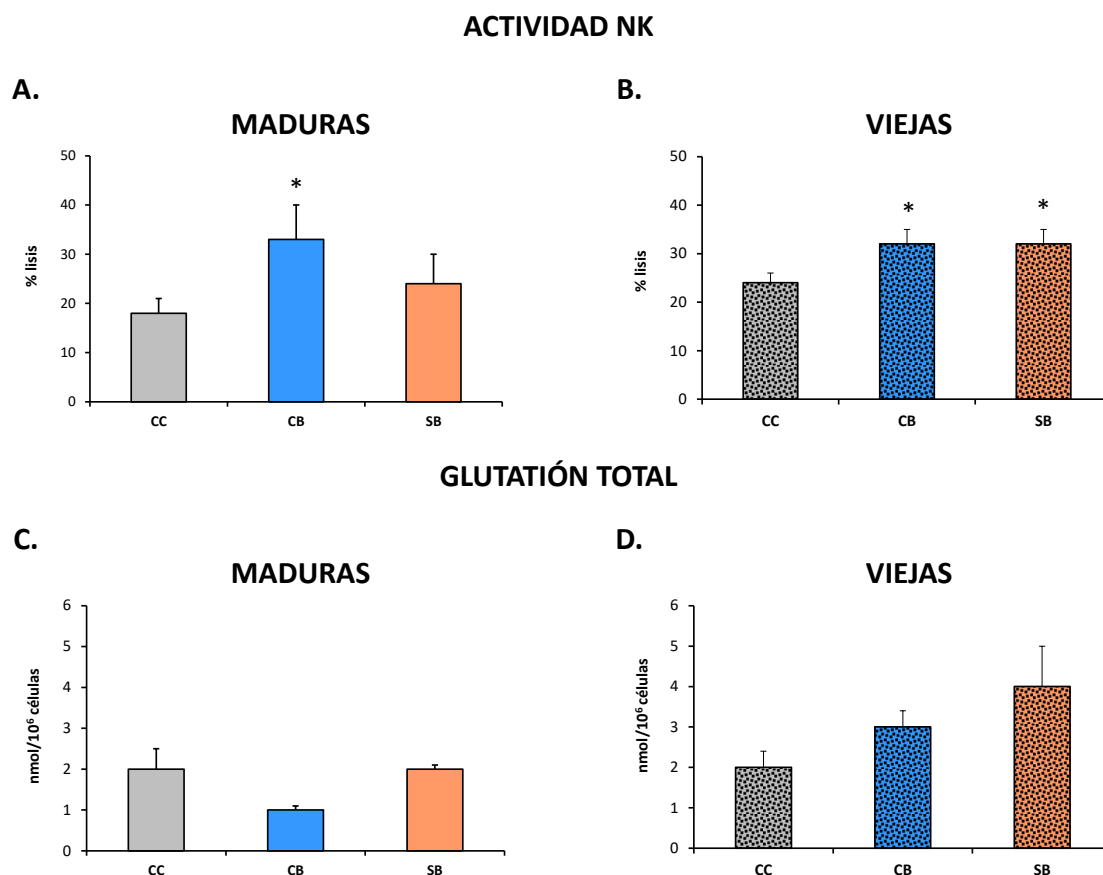
## Resultados

Con respecto a los parámetros de estrés oxidativo determinados en los ratones **viejos** (Tabla 36), no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos del estudio en relación a la capacidad de producir **ROS** en condiciones de estimulación con PMA y látex. En cuanto a las concentraciones intracelulares de **GT** (Fig. 71D), se observa que el protocolo de hidroterapia produjo un ligero aumento de dichos niveles en los ratones viejos, fuera cual fuese el agua utilizada, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a los controles CC.

**Tabla 36. Parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo en leucocitos peritoneales de ratones viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo SB) o con agua corriente (grupo CB) así como de ratones maduros estabulados en condiciones estándar (grupo CC).**

	CC	CB	SB
<b>Parámetros inmunitarios</b>			
<b>Función macrófagos</b>			
<b>Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)</b>			
	280±70	350±53	526±176 ** •
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>			
	59±1	60±1	63±1
<b>Actividad NK (% lisis)</b>			
	24±2	32±3 *	32±3 *
<b>Parámetros estrés oxidativo</b>			
<b>Capacidad de estimulación de producción de ROS (%)</b>			
En presencia de PMA	105±4	112±14	110±8
En presencia de Látex	127±16	144±15	162±15
<b>Concentraciones intracelulares de glutatión total (nmol GT/10<sup>6</sup> células)</b>			
	2±0,4	3±0,4	4±1

Los datos expresan la media ± error estándar de 7-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (índice y eficacia de fagocitosis) o triplicado (actividad NK y producción de ROS). \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. •p<0,05 con respecto al valor obtenido en CB. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, NK: *Natural killer*, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.



**Figura 71.** Parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones maduros (12±1 meses de edad) y viejos (20±1 meses de edad) sometidos a un protocolo de hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupos SB) o con agua corriente (grupos CB) así como de ratones maduros y viejos estabulados en condiciones estándar (grupos CC): actividad citotóxica NK de maduros (A) y viejos (B) y concentraciones intracelulares de glutatión total de maduros (C) y viejos (D). Cada barra representa la media±error estándar de 6-10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales, siendo cada valor la media de ensayos por triplicado en el caso de la actividad NK. \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en CC. CC: ratones estabulados en condiciones estándar, CB: ratones sometidos a hidroterapia con agua corriente, SB: ratones sometidos a hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros.

## 4.5. UTILIZACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CONDUCTA DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, ASÍ COMO LA FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO DE SUS LEUCOCITOS.

### 4.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.

Para profundizar en el estudio de los efectos de un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos, ratones maduros bebieron dicha agua

## Resultados

durante 5 semanas. Los resultados obtenidos de dicho experimento se muestran en las **Tablas 37 y 38** así como en las **Figuras 72 y 73**.

**Tabla 37. Funciones inmunitarias de leucocitos peritoneales de ratones maduros (12±1 meses de edad) que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo GS) o agua corriente (grupo GC) durante 5 semanas.**

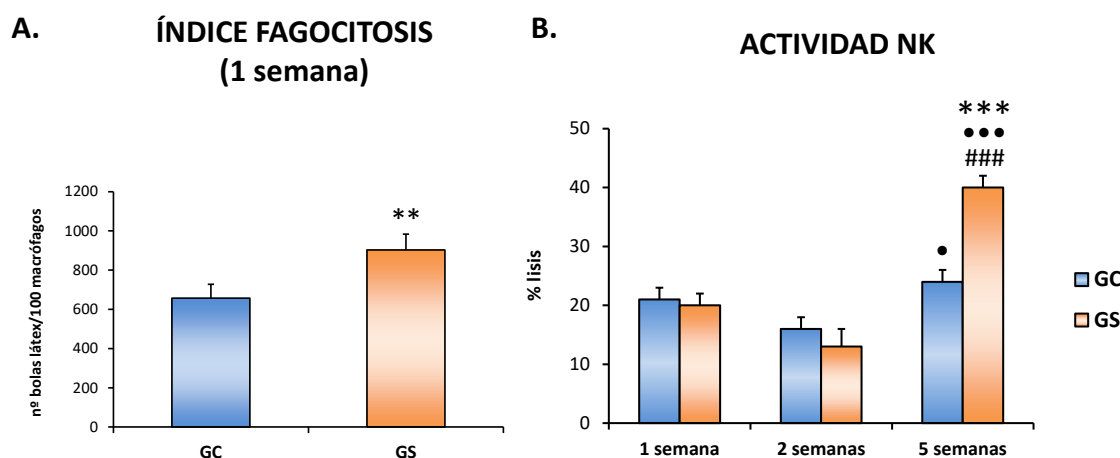
Parámetros función inmunitaria	1 semana	2 semanas	5 semanas
<b>Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)</b>			
grupo GC	657±71	ND	ND
grupo GS	903±81 **	ND	ND
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>			
grupo GC	79±4	ND	ND
grupo GS	96±2 *	ND	ND
<b>Actividad <i>Natural killer</i> (% lisis)</b>			
grupo GC	21±2	16±2	24±2 •
grupo GS	20±2	13±3	40±2 *** ### •••

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (índice y eficacia fagocíticos) o triplicado (actividad *Natural killer*). \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor en GC. ###p<0,001 con respecto al correspondiente valor en la semana 1. •••p<0,001 y •p<0,05 con respecto al mismo valor obtenido en la semana 5. GC: animales control que bebieron agua corriente, GS: animales que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, ND: no hay datos.

En relación a los resultados obtenidos en las valoraciones inmunitarias (**Tabla 37**), se observa que los ratones maduros que bebieron agua mineralo-medicinal (GS) presentaron valores del índice de **fagocitosis** (**Fig. 72A**) y de la eficacia fagocítica mayores que los animales control (GC), tras 1 semana de intervención (p<0,01 y p<0,05, respectivamente). Por su parte, los GS a las 5 semanas de tomar el agua mineralo-medicinal mostraron mayores valores de la **actividad citotóxica NK** en relación a la de los animales GC (p<0,001), y con

## Resultados

respecto a los valores obtenidos en dichos animales GS tras 1 y 2 semanas de administración ( $p < 0,001$  en ambos casos) (Fig. 72B).



**Figura 72. Índice de fagocitosis (A) y actividad citotóxica NK (B) de leucocitos peritoneales de ratones maduros ( $12 \pm 1$  meses de edad) que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (GS) o agua corriente (GC) durante 5 semanas.** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (índice fagocítico) o triplicado (actividad NK). \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto al valor en GC. #### $p < 0,001$  con respecto al correspondiente valor en la semana 1. ••• $p < 0,001$  y • $p < 0,05$  con respecto al mismo valor obtenido en la semana 5. GC: animales control que bebieron agua corriente, GS: animales que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, NK: *Natural killer*.

**Tabla XX2. Parámetros de estrés oxidativo (producción intracelular de ROS en respuesta a PMA y látex y niveles intracelulares de GT) de leucocitos peritoneales de ratones maduros ( $12 \pm 1$  meses de edad) que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (grupo GS) o agua corriente (grupo GC) durante 5 semanas.**

Parámetros estrés oxidativo	1 semana	2 semanas	5 semanas
<b>Producción intracelular ROS (%)</b>			
<b>Estimulación con PMA</b>			
grupo GC	121 $\pm$ 6	122 $\pm$ 7	123 $\pm$ 17
grupo GS	123 $\pm$ 8	123 $\pm$ 9	127 $\pm$ 30
<b>Estimulación con látex</b>			
grupo GC	125 $\pm$ 10	ND	132 $\pm$ 11
grupo GS	140 $\pm$ 17	ND	177 $\pm$ 23 **
<b>Concentración intracelular de GT (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>			
grupo GC	0,41 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,05
grupo GS	0,58 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,05

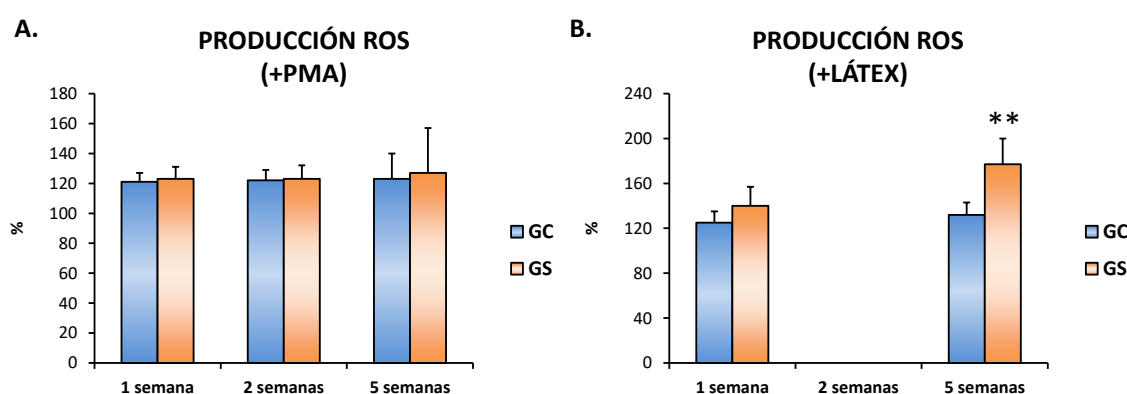
Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en GC. GC: animales



## Resultados

control que bebieron agua corriente, GS: animales que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato, GT: glutatión total, ND: no hay datos.

Los resultados de los parámetros de estrés oxidativo analizados en los leucocitos peritoneales se muestran en la **Tabla 38**. Como se puede observar, los ratones maduros GS tuvieron mayor producción de **ROS** intracelulares en respuesta al látex con respecto a los de los animales control (GC) en la semana 1, alcanzando las diferencias significación estadística en la semana 5 ( $p<0,01$ ) (**Fig. 73B**). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio en cuanto a la producción intracelular de ROS en presencia de PMA (**Fig. 73A**) y en las concentraciones intracelulares de GT (**Tabla 38**).



**Figura 73. Producción intracelular de ROS en presencia de PMA (A) y látex (B) en leucocitos peritoneales de ratones maduros ( $12\pm1$  meses de edad) que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros (GS) o agua corriente (GC) durante 5 semanas.** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por triplicado. \*\* $p<0,01$  con respecto al correspondiente valor en GC. GC: animales control que bebieron agua corriente, GS: animales que bebieron agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, ROS: *Reactive Oxygen Species* o Especies Reactivas de Oxígeno, PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato.

### 4.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.

Los datos resultantes del estudio de los efectos del compuesto Nutrisim® sobre la conducta de ratones hembras viejas así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de estos animales, y sobre su longevidad se recogen desde la **Tabla 39** a la **Tabla 43** y desde la **Figura 74** a la **78**.

En cuanto a los resultados obtenidos del estudio conductual, llevado a cabo tras 2 y 4 semanas de tratamiento con Nutrisim®

(**Tabla 39**), se observa en la prueba de la “tabla de madera” que es el tratamiento de 4 semanas de duración (grupo VT4) el que indujo, en general, una notable mejoría del **equilibrio** y la **coordinación motora** de los ratones viejos en relación con los controles viejos (VC), alcanzando valores similares a los controles adultos (AC). Así, ninguno de los ratones VT4 cayeron de la tabla durante el tiempo de duración de la prueba, con diferencias en relación a los que cayeron de VC e incluso de los VT2 ( $p < 0,001$ , en ambos casos). Además, un mayor porcentaje de animales VT4 fue capaz de completar la prueba ( $p < 0,01$  con respecto a VC y VT2) (**Fig. 74A**) y de realizarla en menos tiempo ( $p < 0,01$  en relación a VC).

Con respecto a los resultados obtenidos en el “tablero de agujeros” (**Tabla 39**), únicamente los ratones VT4 mostraron valores mayores en la **exploración horizontal** (“deambulación total”) con respecto a los VC ( $p < 0,05$ ) e incluso a los AC ( $p < 0,05$ ). Por consiguiente, se observa que el tratamiento de 4 semanas de duración aumentó las deambulaciones externa e interna con respecto a los VC, si bien estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Así mismo, el Nutrisim® ejerció un efecto positivo y significativo sobre la **capacidad exploratoria de tipo vertical**, determinada por las posiciones erguidas mostradas por los ratones. Así, con respecto a los VC, tanto los VT2 como los VT4 mostraron un mayor número de posiciones erguidas ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 74D**) y del tiempo manteniendo esta posición ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente), alcanzando valores similares a los obtenidos en los AC. También, un mayor porcentaje de los ratones tratados con el compuesto adoptaron al menos una posición erguida durante el primer minuto de duración de la prueba ( $p < 0,01$ ) con una menor latencia para la misma ( $p < 0,05$  en VT2 y  $p < 0,01$  en VT4, con respecto a VC), asemejándose a los porcentajes en los AC. Los VT2 y VT4 tuvieron también mayor capacidad para mantener la posición erguida sin necesidad de apoyo (“erguimiento central”) en relación a los controles viejos VC ( $p < 0,001$  para VT2 y  $p < 0,01$  para VT4), obteniéndose de nuevo valores similares a los de los individuos adultos AC. En cuanto a la **exploración dirigida**, se observa que los VT4 presentaron mayor número (**Fig. 74C**) y tiempo de exploración en los agujeros del tablero con respecto al grupo VC ( $p < 0,001$ , en ambos casos). Así mismo, los individuos VT4 tardaron menos tiempo en explorar por primera vez un agujero en comparación con los VC ( $p < 0,001$ ). En relación a las **respuestas de ansiedad**, se observa que el porcentaje de los ratones tratados que se acicalaron durante la prueba fue menor ( $p < 0,001$  para VT2 y  $p < 0,01$  para VT4) y

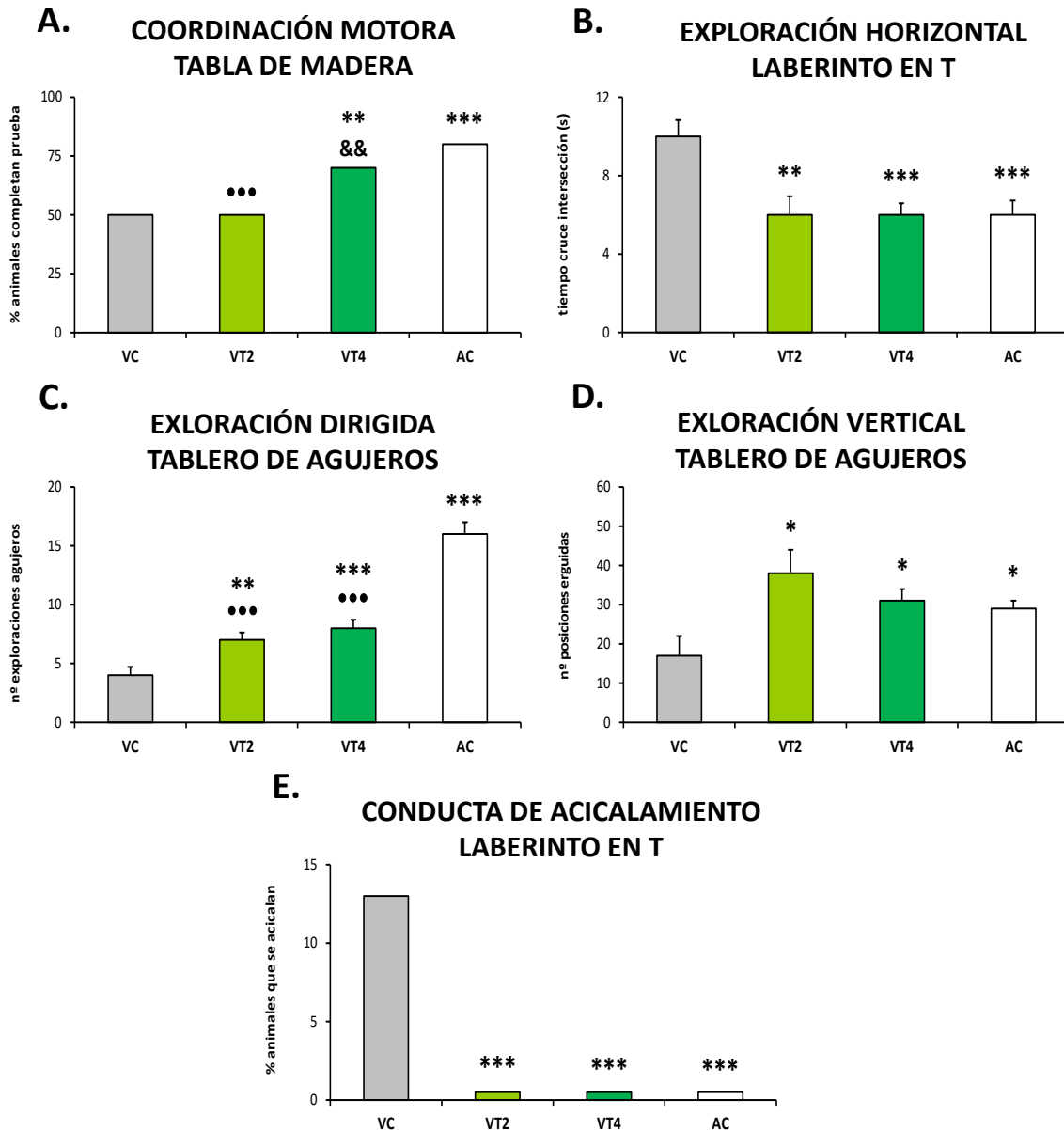
## Resultados

**Tabla 39. Capacidades sensoriomotoras, comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad de ratones viejos (17±1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupo VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9±1 meses de edad) no tratados.**

	VC	VT2	VT4	AC
<b>A. Capacidades sensoriomotoras</b>				
<b>Tabla de Madera</b>				
Equilibrio (% animales que no caen)	87	70 ** ...	100 *** &&&	100 ***
Equilibrio (latencia caída, s)	9±0	16±6 ...	0 *** &&&	0 ***
Coordinación motora (segmentos recorridos)	8,13±1,52	3±0,13 ** •	7±1,63 &	5±0,97
Coordinación motora (% recorrer 1 o más segmentos)	100	70 *** ...	100 &&&	100
Coordinación motora (% prueba completada)	50	50 ...	70 ** &&	80 ***
Coordinación motora (latencia llegada, s)	51±4	44±3	34±4 **	37±5 *
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>				
<b>Tablero de agujeros</b>				
<b>Actividad exploratoria no dirigida</b>				
<b>Actividad horizontal</b>				
Deambulación total (DT)	291±32	314±25	368±15 * •	299±12
Deambulación externa (DE)	204±23	195±16	225±11 ••	172±11
Deambulación interna (DI)	99±16	119±12	130±13	120±9
Cociente DI/DT (%)	30±3	37±3	37±3	43±3 **
<b>Actividad vertical</b>				
% Animales que presentan posición erguida	100	100	100	100
Número total de posiciones erguidas	17±5	38±6 *	31±3 *	29±2 *
Tiempo de posición erguida (s)	17±5	47±7 **	32±3 *	30,14±2,43 *
% Animales que realizan posición erguida en 1º min	75	90 **	90 **	90 **
Latencia 1ª posición erguida (s)	56±13	28±6 *	18±5 **	21±5 **
% Animales que realizan erguimiento central	50	100 ***	70 ** &&& ...	100 ***
<b>Actividad exploratoria dirigida</b>				
% Animales que exploran agujeros	100	100	100	100
Número total de exploraciones en agujeros	4±0,7	7±0,63 ** ...	8±0,71 *** ...	16±1 ***
Tiempo total explorando agujeros (s)	6±2	9±1 ...	17±1 *** &&& ••	35±6 ***
Tiempo hasta 1º agujero (s)	31±5	56±8* ••	25±5 *** && ...	22,11±4,84
<b>Acicalamiento</b>				
% Animales que realizan acicalamiento	100	80 *** ...	90 ** ...	40 ***
Número total de acicalamientos	1,88±0,52	1±0	1,67±0,32 &	1,25±0,16
Tiempo total de acicalamiento (s)	3,75±0,9	4±0,16	4±0,95	3±0,52
% Animales que realizan acicalamiento en 1º min	13	0 ***	0 ***	0 ***
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>				
% Animales que defecan	100	100 ...	90 ** && ...	40 ***
Número de bolas fecales	3±0,55	3±0,37	2±0,45	4±0,7
% Animales que orinan	13	0 ***	10 && ...	0 ***
<b>B. Comportamiento exploratorio y respuestas de ansiedad</b>				
<b>Laberinto T</b>				
<b>Actividad horizontal</b>				
Tiempo cruce intersección (s)	10±0,83	6±0,95 **	6±0,59 ***	6±0,73 ***
Eficacia exploratoria (tiempo total, s)	41±8	28±7	15±2 **	17±3 **
<b>Actividad vertical</b>				
% Animales que presentan posición erguida	100	90 ** ••	100 &&	100
Número total de erguimientos	2±0,5	4±0,69 *	1,80±0,33 &&	3±0,37
<b>Acicalamiento</b>				
% Animales que realizan acicalamiento	13	0 ***	0 ***	0 ***
<b>Conductas de defecación y urinaria</b>				
% Animales que defecan	38	10 *** ••	0 *** &&	0 ***

Los datos expresan la media ± error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en VC. &&p<0,001, &p<0,01 y &p<0,05 con respecto al valor equivalente en VT2. ••p<0,001, •p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor correspondiente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados.

también el de los que lo hicieron durante el primer minuto ( $p<0,001$  para VT2 y VT4), en comparación con los VC. En cuanto a las conductas de defecación y urinaria, también relacionadas con la ansiedad, un menor porcentaje de los individuos tratados durante 4 semanas (VT4) defecaron en relación a los VC ( $p<0,01$ ) e incluso a los VT2 ( $p<0,01$ ). Por el contrario, son los ratones VT2 los que orinaron menos en relación a los controles viejos ( $p<0,001$ ), alcanzando niveles similares a los controles adultos. Atendiendo a los resultados del “laberinto en T”, el compuesto indujo una mejora en la respuesta ante el laberinto, asemejándose los valores a la de los AC. Así, los animales tratados, independientemente del tiempo de tratamiento, requirieron menos tiempo para cruzar la intersección del laberinto con respecto a los VC ( $p<0,01$  para VT2 y  $p<0,001$  para VT4) (**Fig. 74B**). Además, los VT4 presentaron mayor **eficacia exploratoria**, esto es, los ratones VT4 necesitaron menos tiempo para explorar el laberinto en su totalidad en relación al grupo VC ( $p<0,01$ ) y alcanzaron tiempos similares a los AC. Con respecto a la actividad vertical, cabe destacar que los ratones tratados mostraron un mayor número de erguimientos con respecto a los ratones VC ( $p<0,05$ ), alcanzando esta diferencia la significación estadística en los VT2. En referencia a las **respuestas de ansiedad**, ninguno de los ratones tratados con Nutrisim© realizó conducta de acicalamiento en relación a los controles viejos CV ( $p<0,001$ ) de forma similar a lo que ocurre en los ratones AC (**Fig. 74E**). De forma similar, una menor proporción de ratones tratados defecaron durante la prueba con respecto a los individuos CV ( $p<0,001$ ), alcanzando valores similares a los observados en los ratones CA, particularmente tras el tratamiento de 4 semanas.



**Figura 74.** Coordinación motora en la “tabla de madera” (A), exploración horizontal en el “laberinto en T” (B), exploración dirigida (C) y vertical (D) en el “tablero de agujeros” y conducta de acicalamiento en el “laberinto en T” (E) de ratones viejos ( $17 \pm 1$  meses) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 4 semanas (grupo VT) o no (grupo CV), así como de ratones adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad) no tratados (grupo AC). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en CV. & $p < 0,01$  con respecto a VT2. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados.

## Resultados

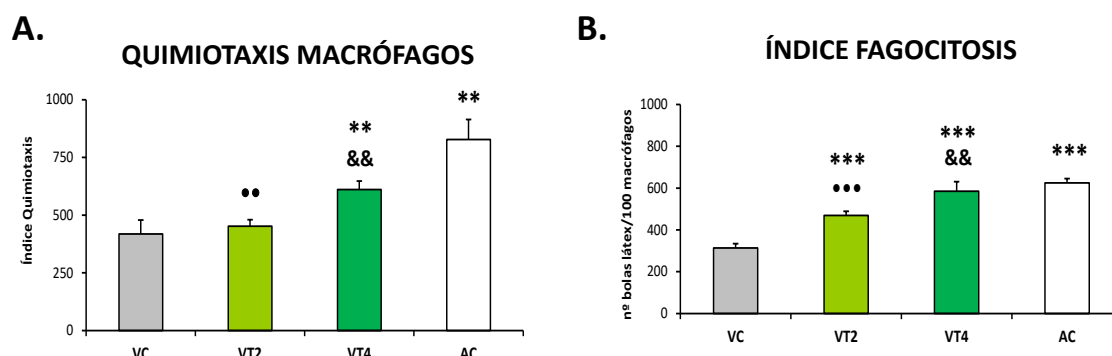
**Tabla 40. Funciones inmunitarias de los leucocitos peritoneales de ratones viejos (17±1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupo VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9±1 meses de edad) no tratados.**

<b>A</b>	Función macrófagos	VC	VT2	VT4	AC
<b>Índice de quimiotaxis (n° macrófagos)</b>					
	419±60	452±28 **	611±37 ** &&	828±87 **	
<b>Índice de fagocitosis (n° de bolas de látex)</b>					
	313±21	469±20 *** ...	585±46 *** &&	624±21 ***	
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>					
	50±2	60±2 *** ...	63±2 *** ...	80±2 ***	
<b>Concentraciones intracelulares de anión superóxido (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>					
Basales	73±3	ND	66±7 **	33±6 ***	
Estimulados con látex	79±8	ND	83±10 **	45±5 ***	
<b>B</b>	Función linfocitos	VC	VT2	VT4	AC
<b>Índice de quimiotaxis (n° linfocitos)</b>					
	397±16	640±67 ** •	657±39 *** •	785±39 ***	
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>					
Basal	1225±257	1780±184 * **	761±99 &&&	928±79	
En respuesta a LPS	1726±124	6486±973 ***	1921±125 ... &&	4581±100 ***	
En respuesta a ConA	1678±134	3871±581 ** **	1571±69 ** &&	8502±802 ***	
<b>Actividad Natural killer</b>					
<b>Actividad Natural killer (% lisis)</b>					
	14±3	22±3 *	30±3 ***	28±1 ***	

Los datos expresan la media ± error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis, fagocitosis y niveles intracelulares de anión superóxido) o triplicado (proliferación y actividad NK). \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en VC. &&&p<0,001 y &&p<0,01 con respecto al valor equivalente en VT2. ...p<0,001, \*\*p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor correspondiente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, ND: no hay datos.

Los resultados obtenidos referentes a las valoraciones inmunitarias se muestran en las **Tablas 40A y 40B**.

Con respecto a las **funciones** valoradas en los **macrófagos** peritoneales (**Tabla 40A**), la capacidad de **quimiotaxis** de estas células fue mayor en los ratones tratados durante 4 semanas con Nutrisim® (grupo VT4) en comparación con la de los controles viejos VC y con la obtenida tras 2 semanas de tratamiento (VT2) ( $p < 0,01$  en ambos casos), alcanzando valores similares a los de los AC (**Fig. 75A**).



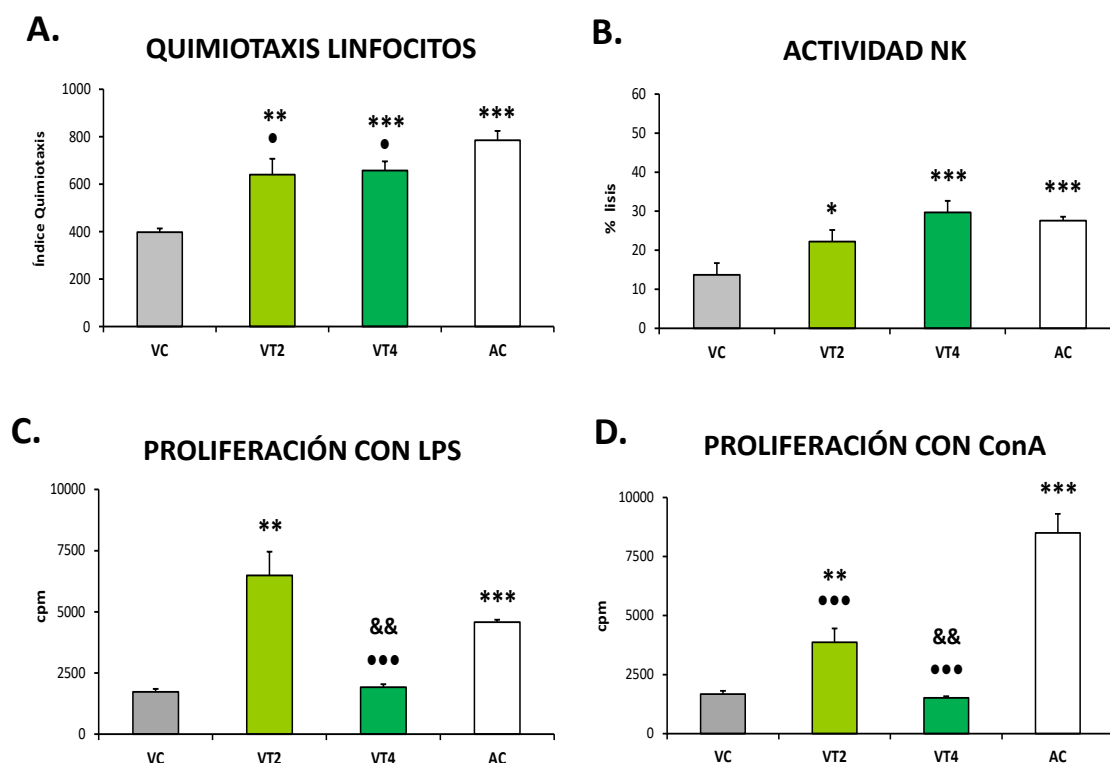
**Figura 75. Quimiotaxis (A) e Índice Fagocítico (B) de macrófagos peritoneales de ratones viejos ( $17 \pm 1$  meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupo VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo CV), así como de ratones adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad) no tratados (grupo AC).** Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en CV. && $p < 0,01$  con respecto a VT2. ••• $p < 0,001$  y •• $p < 0,01$  con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados.

Atendiendo a la **capacidad fagocítica**, los macrófagos peritoneales de los ratones tratados, independientemente del tiempo de tratamiento, presentaron mayores índice (**Fig. 75B**) y eficacia fagocíticas con respecto a los de los VC ( $p < 0,001$  para VT2 y VT4, en ambos parámetros) asemejándose al valor observado en los controles de edad adulta (AC), particularmente tras 4 semanas de tratamiento. No obstante, las concentraciones de anión superóxido intracelular de los ratones VT4 no se diferenciaron de los observados en los VC, ni en condiciones de reposo ni bajo estimulación en presencia de látex.

Atendiendo al estudio de la **funcionalidad** en los **linfocitos** peritoneales (**Tabla 75B**), el tratamiento con Nutrisim® produjo una mayor quimiotaxis de estas células con respecto a los controles viejos VC ( $p < 0,01$  para VT2 y  $p < 0,001$  para VT4) (**Fig. 76A**). En cuanto a la **capacidad de proliferación** de los linfocitos en ausencia de estímulo (basal), en VT2 se dieron mayores valores con respecto al grupo VC ( $p < 0,05$ ), no observándose diferencias en los VT4. Por su parte, fue en VT2 en donde se encontraron mayores valores de la respuesta

## Resultados

proliferativa tanto al **LPS** como a la **ConA** (**Fig. 76 C y D**, respectivamente) en comparación con la observada en VC ( $p < 0,01$  en ambos casos), asemejándose a los valores que presentaron los CA, especialmente en el caso de la respuesta linfoproliferativa frente al LPS. En lo referente a la **actividad citotóxica NK**, el tratamiento con Nutrisim® indujo mayores valores de la misma (**Fig. 76B**) en relación a los VC ya transcurridas 2 semanas ( $p < 0,05$ ) y, particularmente, tras 4 semanas ( $p < 0,001$ ), alcanzando valores similares a los obtenidos en los ratones AC.



**Figura 76.** Quimiotaxis de linfocitos (A), actividad NK (B) y linfoproliferación en respuesta a LPS (C) y ConA (D) en leucocitos peritoneales de ratones viejos ( $17 \pm 1$  meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupo VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo VC), así como de ratones adultos ( $9 \pm 1$  meses de edad) no tratados (grupo AC). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  con respecto al correspondiente valor en VC. && $p < 0,01$  con respecto a VT2. ••• $p < 0,001$  y •• $p < 0,01$  con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados.

Los resultados obtenidos en la determinación de las **concentraciones de citoquinas** secretadas en cultivo por los leucocitos peritoneales en **presencia** de los mitógenos **LPS y ConA**, se recogen en la **Tabla 41**. Dado que fue el tratamiento de 2 semanas de



## Resultados

**Tabla 41. Concentraciones de las citoquinas IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL2 e IL17 secretadas por los leucocitos peritoneales en cultivo en presencia de los mitógenos LPS y ConA de ratones viejos (17 $\pm$ 1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 semanas de duración (grupo VT2) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9 $\pm$ 1 meses de edad) no tratados.**

Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos peritoneales en cultivo	VC	VT2	VT4	AC
<b>IL1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>				
LPS	44 $\pm$ 5	66 $\pm$ 8 $\mu$ ••	ND	97 $\pm$ 3 ***
ConA	35 $\pm$ 7	66 $\pm$ 10 *	ND	65 $\pm$ 4 **
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>				
LPS	31 $\pm$ 4	27 $\pm$ 4 •••	ND	132 $\pm$ 4 ***
ConA	35 $\pm$ 2	50 $\pm$ 7 •••	ND	94 $\pm$ 4 ***
<b>IL6 (pg/mL)</b>				
LPS	1598 $\pm$ 98	2076 $\pm$ 237	ND	1591 $\pm$ 29
ConA	862 $\pm$ 54	1866 $\pm$ 249 ** •	ND	913 $\pm$ 43
<b>IL10 (pg/mL)</b>				
LPS	546 $\pm$ 93	286 $\pm$ 53 * •••	ND	834 $\pm$ 22 ***
ConA	154 $\pm$ 17	224 $\pm$ 37	ND	282 $\pm$ 12 ***
<b>IL2 (pg/mL)</b>				
LPS	0,14 $\pm$ 0,04	3,85 $\pm$ 0,36 *** •••	ND	1,39 $\pm$ 0,19 ***
ConA	38 $\pm$ 7	343 $\pm$ 81 * ••	ND	97 $\pm$ 7 ***
<b>IL17 (pg/mL)</b>				
LPS	200 $\pm$ 24	1595 $\pm$ 162 *** •••	ND	198 $\pm$ 10
ConA	150 $\pm$ 35	2610 $\pm$ 162 *** •••	ND	176 $\pm$ 10

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 y 0,05> $\mu$ <0,1 con respecto al valor correspondiente en VC. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor correspondiente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, IL: Interleuquina, TNF: *Tumor Necrosis Factor* o Factor de Necrosis Tumoral, ND: no hay datos.

duración el que indujo una mejor respuesta proliferativa de los linfocitos a los mitógenos utilizados, las citoquinas se valoraron en las muestras procedentes de los cultivos de los leucocitos de esos ratones (grupo VT2). Con respecto a las concentraciones de la IL1 $\beta$ , se observa que los leucocitos de los VT2 secretaron mayores cantidades que los de los VC, diferencias que se quedan en tendencia estadística en presencia de LPS y alcanzan la significación estadística en el caso de la ConA

( $p < 0,05$ ). Además, estos valores mayores de  $IL1\beta$  observados se acercan a los obtenidos en las muestras procedentes de los ratones AC, esto sucede concretamente en el caso de la  $IL1\beta$  secretada por las células inmunitarias en presencia de ConA. En relación a las concentraciones de las citoquinas  $TNF\alpha$  e  $IL6$ , el tratamiento no ejerció efecto alguno en el  $TNF\alpha$  en presencia de ambos mitógenos, obteniéndose valores similares a los de los VC. En el caso de la **IL6**, sólo en presencia de la ConA, los leucocitos de los ratones tratados secretaron mayor cantidad de esta citoquina en comparación con los del grupo VC ( $p < 0,01$ ) e incluso con los del grupo AC ( $p < 0,05$ ). Atendiendo a las concentraciones de la citoquina **IL10**, se observó una mayor cantidad de la misma en los ratones tratados con respecto a los controles viejos en presencia de ConA asemejándose a los valores obtenidos en los controles adultos, si bien éste valor no alcanzó la significación estadística. Por su parte, el tratamiento indujo un descenso de esta citoquina en presencia de LPS en relación a los VC ( $p < 0,05$ ) y AC ( $p < 0,001$ ). En referencia a la **IL2**, los ratones tratados con el compuesto mostraron mayor cantidad de esta citoquina tanto en presencia de LPS como de ConA en comparación con los VC ( $p < 0,001$  y  $p < 0,05$  respectivamente) y también con los AC ( $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  respectivamente). Finalmente, el tratamiento también indujo valores mayores de **IL17** en presencia de ambos mitógenos en comparación con los de los VC y adultos AC ( $p < 0,001$  en todos los casos).

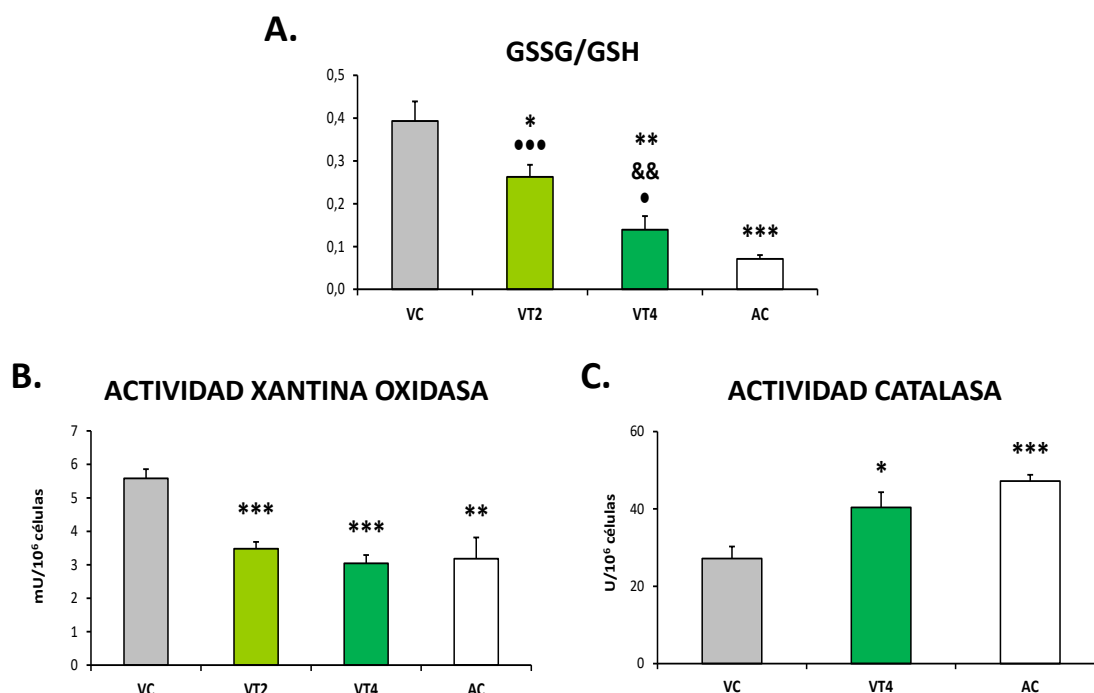
La **Tabla 42** y la **Figura 77**, recogen los resultados obtenidos de las valoraciones de los parámetros de estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales pertenecientes a los cuatro grupos de ratones del presente estudio (VT2, VT4, VC y AC). Con respecto a la forma reducida del glutatión (**GSH**), se observa que los animales VT4 mostraron un menores cantidades de este antioxidante con respecto a los VC ( $p < 0,05$ ). Por su parte, el tratamiento con Nutrisim® indujo menores cantidades de la forma oxidada del glutatión (**GSSG**) que las obtenidas en VC, diferencias que fueron estadísticamente significativas en VT4 ( $p < 0,01$ ). Atendiendo a la relación entre ambas formas del glutatión, el **cociente GSSG/GSH** (**Fig. 77A**), se observa que los VT2 y especialmente los VT4 lo muestran con valores menores que los encontrados en VC ( $p < 0,05$  para VT2 y  $p < 0,01$  para VT4), acercándose los mismos a los observados en el grupo AC. En cuanto a los resultados de la **XO** (**Fig. 77B**), el tratamiento, tanto VT2 como VT4, indujo unos valores significativamente menores de esta actividad con respecto a los VC ( $p < 0,001$  en ambos casos) y similares a los observados en los AC.

## Resultados

**Tabla 42. Parámetros de estrés oxidativo de leucocitos peritoneales de ratones viejos (17±1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupo VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9±1 meses de edad) no tratados.**

Parámetros estrés oxidativo	VC	VT2	VT4	AC
<b>Concentraciones intracelulares de GSH (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>				
	93±5	90±5	77±3 *	94±9
<b>Concentraciones intracelulares de GSSG (nmol/10<sup>6</sup> células)</b>				
	37±5	28±3 ***	14±2 ** & •	5±0,8 ***
<b>Cociente GSSG/GSH</b>				
	0,39±0,05	0,26±0,03 * ***	0,14±0,03 ** && •	0,07±0,01 ***
<b>Actividad XO (mU.I./10<sup>6</sup> células)</b>				
	6±0,3	4±0,2 ***	3±0,3 ***	3±0,6 ***
<b>Actividad CAT (U.I./10<sup>6</sup> células)</b>				
	27±3	ND	40±4 *	47±2 ***
<b>Actividad GR (mU.I./10<sup>6</sup> células)</b>				
	59±3	ND	64±5 ••	94±3 ***
<b>Actividad GPx (mU.I./10<sup>6</sup> células)</b>				
	250±49	ND	258±38 ••	447±21 **

Los datos expresan la media ± error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al valor correspondiente en VC. &&p<0,01 y &p<0,05 con respecto al valor equivalente en VT2. •••p<0,001, ••p<0,01 y •p<0,05 con respecto al valor correspondiente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, XO: xantina oxidasa, CAT: catalasa, GR: glutatión reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, ND: no hay datos.



**Figura 77.** Cociente GSSG/GSH (A), actividad xantina oxidasa (B) y actividad catalasa (C) de leucocitos peritoneales de ratones viejos (17±1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 2 y 4 semanas de duración (grupos VT2 y VT4, respectivamente) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9±1 meses de edad) no tratados (grupo AC). Cada barra representa la media ± error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. \*\*\*p<0,001 y \*\*p<0,01 con respecto al correspondiente valor en CV. &&p<0,01 con respecto a VT2. •••p<0,001 y •p<0,05 con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos controles no tratados, VT2: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 2 semanas, VT4: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas, AC: ratones adultos controles no tratados, GSSG: glutatión oxidado, GSH: glutatión reducido.

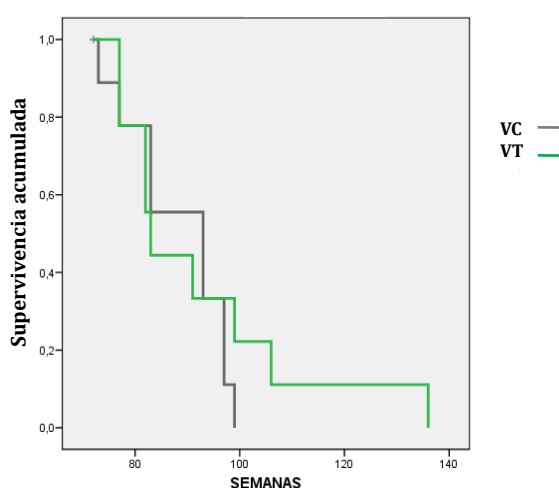
Teniendo en cuenta que el tratamiento de 4 semanas de duración con Nutrisim® pareció ejercer un efecto más notable sobre el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales, fue en las células de los ratones tras ese tiempo de tratamiento (grupo VT4) en las que se valoraron otros parámetros de estrés oxidativo. Así, con respecto a la enzima **catalasa** (Fig. 77C), se observa una actividad mayor en los ratones VT4 en comparación con los VC (p<0,05), alcanzando valores similares a los obtenidos en los AC. No obstante, en VT4 no se apreciaron diferencias con los VC en las actividades de las enzimas participantes en el ciclo del glutatión, **GR y GPx** (Tabla 42).

## Resultados

**Tabla 43. Longevidades media y máxima en semanas de ratones viejos ( $17\pm 1$  meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 4 semanas de duración (grupo VT) o no (grupo VC).**

Longevidad media	VC	VT
Longevidad media (semanas)	$88\pm 3$	$93\pm 6$
Longevidad máxima (semanas)	99	136

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 10 valores pertenecientes a ese mismo número de animales. VC: ratones viejos controles no tratados, VT: ratones viejos tratados con Nutrisim® durante 4 semanas.



**Figura 78. Longevidad media en semanas de ratones viejos ( $17\pm 1$  meses de edad) que recibieron un tratamiento con Nutrisim® de 4 semanas de duración (grupo VT) o no (grupo VC).**

Finalmente, en relación a los resultados del análisis estadístico de la **longevidad media** alcanzada tanto por los ratones viejos tratados con Nutrisim® como por los controles viejos no tratados (Tabla 43) se observa que el tratamiento de 4 semanas de duración con el compuesto en la vejez no parece alargar la longevidad media de los individuos en comparación con la de los animales viejos no tratados (Fig. 78). No obstante, cabe destacar que un 20% de los ratones tratados con este compuesto sobrevivieron a los ratones controles viejos, alcanzando edades muy avanzadas. De hecho, un 10% de los

individuos sometidos al tratamiento alcanzaron una edad muy longeva: 136 semanas o 34 meses de edad, frente a las 99 semanas o 25 meses alcanzados por los animales controles no tratados.

### 4.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones macho viejos.

Los resultados obtenidos del estudio de los efectos del atenolol sobre la función de leucocitos peritoneales en ratones macho viejos se mostrarán a continuación y se encuentran recogidos en las **Tablas 44 y 45** y en las **Figuras 79 y 80**.

**Tabla 44. Funciones de los macrófagos peritoneales de ratones macho viejos (18 meses de edad) sometidos a un tratamiento crónico con atenolol (viejo-AT) o no tratados (viejo-C) así como de ratones macho adultos (6 meses) (adulto-C).**

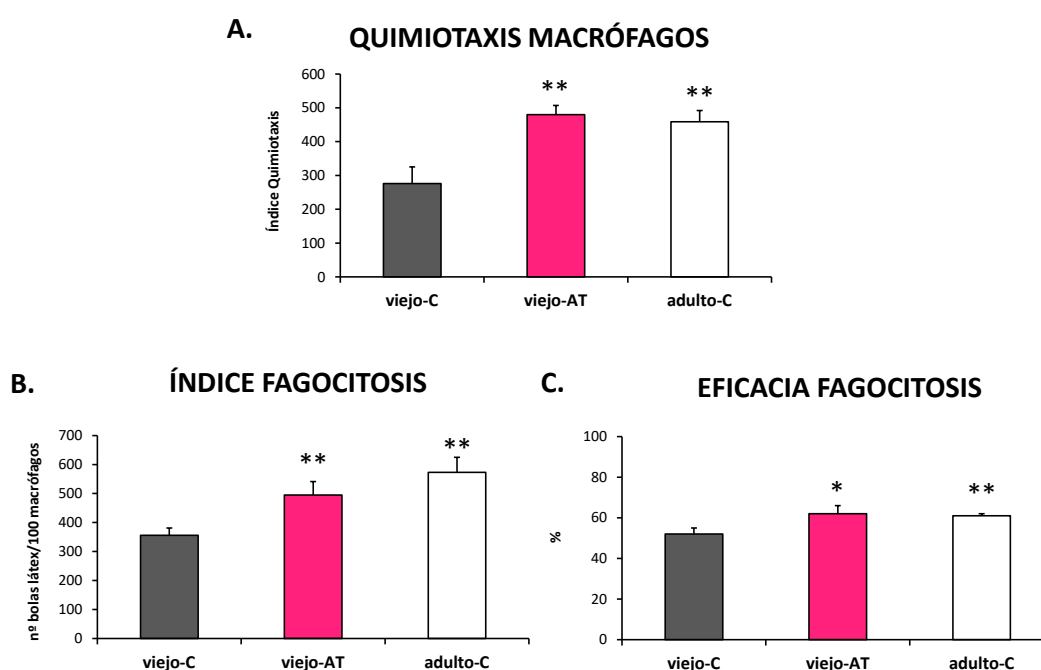
Función macrófagos	viejo-C	viejo-AT	adulto-C
<b>Índice de quimiotaxis (nº macrófagos)</b>	276±49	480±27 **	459±33 **
<b>Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)</b>	356±25	495±46 **	573±52 **
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>	52±3	62±4 *	61±1 **

Los datos expresan la media ± error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor en viejo-C. viejo-C: ratones control viejos, viejo-AT: ratones tratados con atenolol viejos, adulto-C: ratones control adultos.

Atendiendo a las **funciones** de **macrófagos** peritoneales valoradas (**Tabla 44**), el tratamiento crónico con atenolol indujo en los ratones viejos una mayor capacidad de **quimiotaxis** (p<0,01) (**Fig. 79A**) así como del índice (p<0,01) y de la eficacia (p<0,05) **fagocíticas** (**Figs. 79B y 79C**, respectivamente) en relación a los ratones viejos control. Además, los ratones viejos-AT mostraron en estos parámetros valores similares a los obtenidos en los adultos controles (adulto-C).

Con respecto a los resultados de las **funciones** estudiadas en los **linfocitos** peritoneales (**Tabla 45**), los ratones viejos tratados con atenolol (viejo-AT) mostraron una mayor capacidad de **quimiotaxis**

(Fig. 80A) en relación a los animales del grupo viejo-C ( $p<0,001$ ), alcanzando un valor similar al obtenido en los controles adultos. Por su parte, el tratamiento con atenolol produjo una mayor **proliferación en respuesta a la ConA** ( $p<0,05$ ) en los ratones viejos con respecto a los controles de su misma edad cronológica. Así mismo, los leucocitos peritoneales de los animales viejos-AT también presentaron una mayor **capacidad de proliferación frente al LPS** (Fig. 80B) que los de los ratones viejos control, si bien esta diferencia no alcanzó la significación estadística. No se obtuvieron diferencias reseñables entre los grupos de estudio referente a la proliferación basal de los leucocitos.



**Figura 79.** Quimiotaxis (A), índice fagocítico (B) y eficacia fagocítica (C) de macrófagos peritoneales de ratones macho viejos (18 meses de edad) sometidos a un tratamiento crónico con atenolol (viejo-AT) o no tratados (viejo-C) así como de ratones macho adultos (6 meses) (adulto-C). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al valor correspondiente en viejo-C. Viejo-C: ratones control viejos, viejo-AT: ratones tratados con atenolol viejos, adulto-C: ratones control adultos.

Así mismo, como se puede observar en la **Tabla 45**, el tratamiento con atenolol produjo en los ratones viejos-AT una mayor **actividad citotóxica NK** en comparación con la de los controles viejos ( $p<0,01$ ), alcanzando un nivel similar al observado en los controles de edad adulta (Fig. 80C).

## Resultados

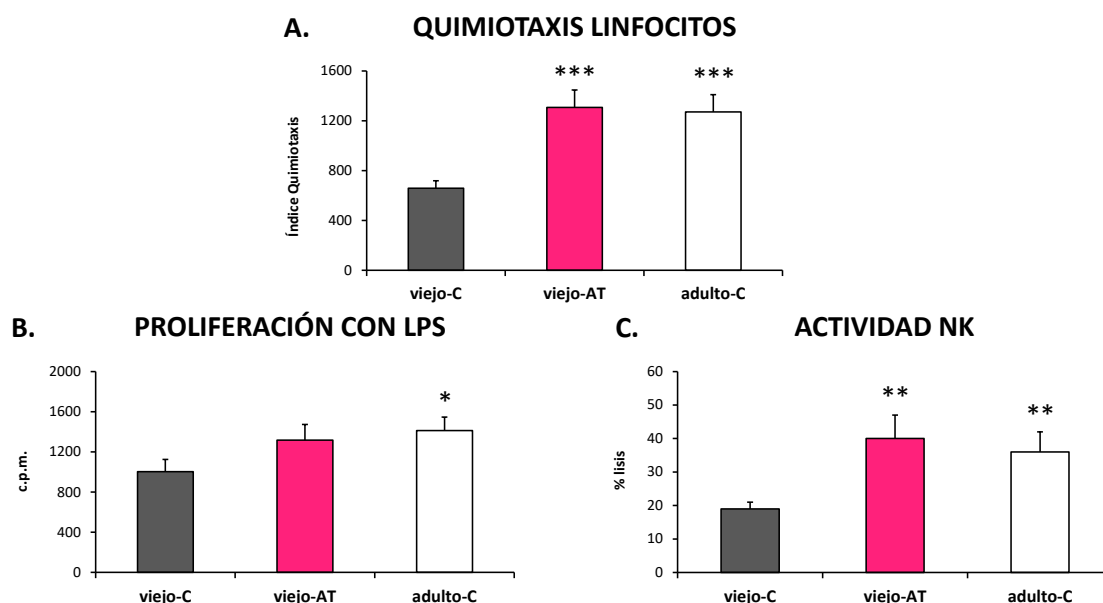
**Tabla 45. Funciones de los linfocitos y actividad citotóxica NK de los leucocitos peritoneales de ratones macho viejos (18 meses de edad) sometidos a un tratamiento crónico con atenolol (viejo-AT) o no tratados (viejo-C) así como de ratones macho adultos (6 meses) (adulto-C).**

Función linfocitos	viejo-C	viejo-AT	adulto-C
<b>Índice de quimiotaxis (nº linfocitos)</b>			
	658±60	1307±140 ***	1271±139 ***
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>			
Basal	781±111	857±92	898±129
En respuesta a LPS	1003±122	1317±156	1412±134 *
En respuesta a ConA	992±135	1548±224 *	1179±259
<b>Actividad <i>Natural killer</i></b>			
<b>Actividad <i>Natural killer</i> (% lisis)</b>			
	19±2	40±7 **	36±6 **

Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al correspondiente valor en viejo-C. viejo-C: ratones control viejos, viejo-AT: ratones tratados con atenolol viejos, adulto-C: ratones control adultos.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos en los grupos de ratones controles viejos (viejo-C) y adultos (adulto-C), se puede observar como el proceso de envejecimiento lleva a un deterioro de los parámetros inmunitarios valorados de manera que los ratones adultos presentaron, en general, mayores capacidades quimiotáctica (de macrófagos y linfocitos) y fagocítica, una mayor actividad citotóxica NK y una mayor capacidad de proliferación, especialmente en respuesta al LPS, que los ratones viejos control (**Tablas 44 y 45**).





**Figura 80.** Quimiotaxis (A), proliferación en presencia de LPS (B) y actividad citotóxica NK (C) de leucocitos peritoneales de ratones macho viejos (18 meses de edad) sometidos a un tratamiento crónico con atenolol (viejo-AT) o no tratados (viejo-C) así como de ratones macho adultos (6 meses) (adulto-C). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 8 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (quimiotaxis) o triplicado (proliferación y actividad NK). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$  con respecto al valor correspondiente en viejo-C. Viejo-C: ratones control viejos, viejo-AT: ratones tratados con atenolol viejos, adulto-C: ratones control adultos, LPS: Lipopolisacárido, NK: Natural killer, c.p.m.: cuentas por minuto.

#### 4.5.4. Efectos de un tratamiento de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función de leucocitos en ratones viejos.

Los resultados relativos a los efectos de una terapia de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función de los leucocitos peritoneales de ratones viejos se recogen en la **Tabla 46 (A y B)** así como en la **Fig. 81**.

Con respecto a los resultados obtenidos de las **funciones** estudiadas en los **macrófagos peritoneales** (**Tabla 46A**), cabe destacar que estas células de los VP presentaron un mayor índice de **fagocitosis** con respecto a los ratones VC ( $p < 0,01$ ), alcanzando un valor similar al obtenido en los AC (**Fig. 81A**). Así mismo, se observa que los ratones VP también muestran un ligero aumento en la eficacia fagocítica con respecto a los VC, si bien éste no alcanza la significación estadística. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones intracelulares de anión superóxido producidas en

## Resultados

condiciones de estimulación con látex entre los distintos grupos de estudio.

**Tabla 46. Funciones inmunitarias de los leucocitos peritoneales de ratones viejos (21±1 meses de edad) que recibieron un tratamiento con Pulsarión® de 4 semanas (grupo VP) o no (grupo VC), así como de ratones adultos (9±1 meses de edad) no tratados.**

**A**

Función macrófagos	VC	VP	AC
<b>Índice de fagocitosis (nº de bolas de látex)</b>			
	280±36	580±83 **	598±39 ***
<b>Eficacia de fagocitosis (% macrófagos fagocíticos)</b>			
	59±4	68±2 •	79±4 *
<b>% estimulación concentraciones intracelulares de anión superóxido</b>			
	188±15	178±8 •	269±35

**B**

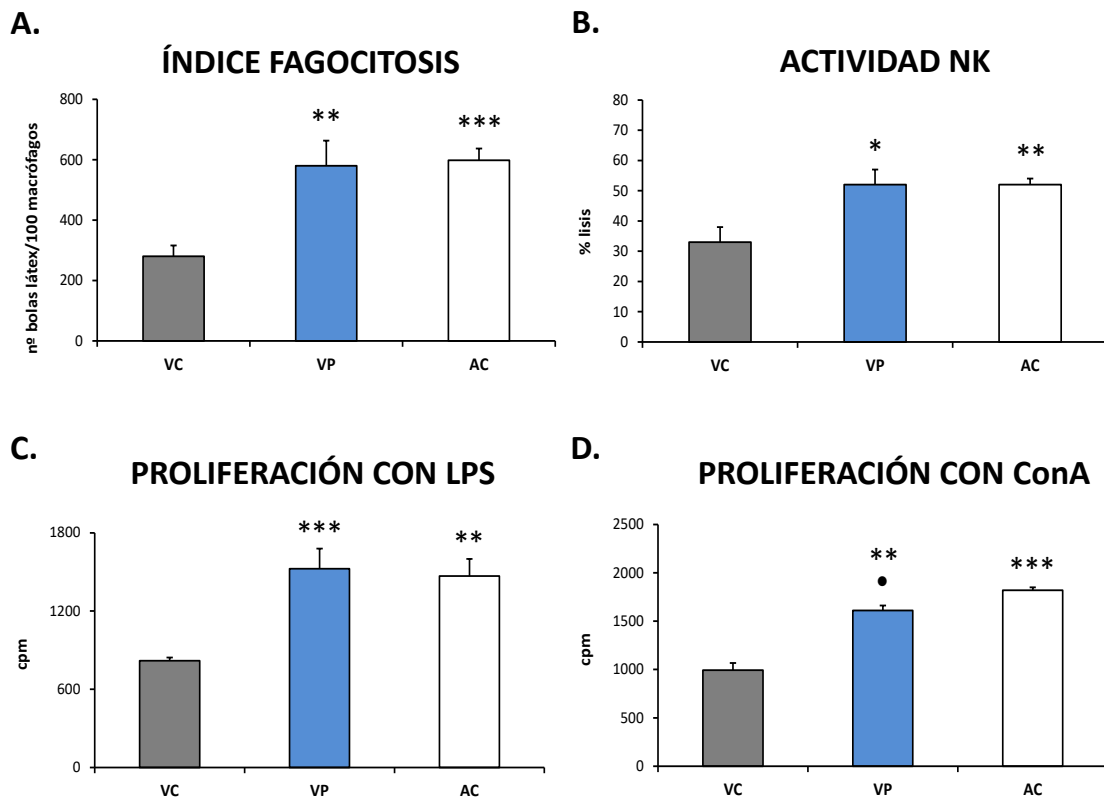
Función linfocitos	VC	VP	AC
<b>Proliferación (cuentas por minuto)</b>			
Basal	700±75	986±101 *	830±88
En respuesta a LPS	819±24	1524±155 ***	1468±132 **
En respuesta a ConA	993±75	1610±52 ** •	1819±31 ***
<b>Actividad Natural killer</b>			
<b>Actividad Natural killer (% lisis)</b>			
	33±5	52±5 *	52±2 **

Los datos expresan la media ± error estándar de 5-7 valores pertenecientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos por duplicado (fagocitosis, niveles intracelulares de anión superóxido) o triplicado (proliferación y actividad NK). \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 y \*p<0,05 con respecto al correspondiente valor en VC. •p<0,05 con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos control, VP: ratones viejos tratados con Pulsarión®, AC: ratones adultos control, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A.

Atendiendo a las **funciones de linfocitos** y a la **actividad citotóxica NK** leucocitaria (**Tabla 46B**), se observa que los VP presentaron mayor capacidad de proliferación tanto basal (p<0,05)

## Resultados

como en respuesta a los mitógenos LPS (**Fig. 81C**) ( $p<0,001$ ) y ConA (**Fig. 81D**) ( $p<0,01$ ) con respecto a los VC, alcanzando valores similares a los obtenidos en los AC, con excepción de la proliferación en presencia de ConA. Así mismo, los leucocitos de los ratones VP mostraron una mayor actividad citotóxica NK en relación a los animales VC ( $p<0,05$ ), siendo ésta similar a la observada en los adultos AC (**Fig. 81B**).



**Figura 81.** Índice de fagocitosis (A), actividad citotóxica NK (B) y proliferación en presencia de LPS (C) y ConA (D) de leucocitos peritoneales de ratones viejos ( $21\pm 1$  meses de edad) que recibieron un tratamiento con Pulsarión® de 4 semanas (grupo VP) o no (grupo VC), así como de ratones adultos ( $9\pm 1$  meses de edad) no tratados. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de 5-7 valores correspondientes a ese mismo número de animales y siendo cada valor la media de ensayos realizados por duplicado (índice fagocítico) o triplicado (actividad NK y proliferación). \*\*\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,01$  y \* $p<0,05$  con respecto al correspondiente valor en VC. • $p<0,05$  con respecto al valor equivalente en AC. VC: ratones viejos control, VP: ratones viejos tratados con Pulsarión®, AC: ratones adultos control, NK: *Natural killer*, LPS: Lipopolisacárido, ConA: Concanavalina A, c.p.m.: cuentas por minuto.

# Discusión



### 5.1 PROFUNDIZACIÓN Y NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DE LA INMUNOSENESCENCIA EN EL ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO EN RATONES.

#### 5.1.1. Cambios con la edad en la elasticidad de la membrana plasmática de linfocitos T.

La elasticidad (módulo elástico,  $E$ ), parámetro biomecánico celular, se valoró en el presente subobjetivo mediante técnicas de aspiración con micropipeta, que permiten obtener el valor de dicho parámetro en cada célula de forma independiente. Esta determinación se llevó a cabo en los linfocitos T peritoneales, obtenidos por técnicas basadas en la diferencias de adhesión de las células inmunitarias, a lo largo de distintas edades (adulto-madura, vieja y muy vieja) de un mismo grupo de ratones hembra ICR-CD1 ex-reproductoras. Así mismo, también se analizó la posible existencia de una relación entre los valores de este parámetro en la edad adulta con la esperanza de vida de los individuos.

Aunque con la edad, las células experimentan cambios en sus propiedades biomecánicas, incluyéndose un incremento de la rigidez y viscosidad de su membrana y una menor capacidad para deformarse (Starodubtseva, 2011), lo que implica cambios en importantes funciones celulares, los resultados obtenidos en este subobjetivo indican, que al envejecer no se produce un cambio significativo en los valores del módulo elástico ( $E$ ), esto es, en la elasticidad de los linfocitos T peritoneales totales. Si bien se ha propuesto que las causas que subyacen a los cambios biomecánicos celulares con la edad, concretamente al aumento de la rigidez de las células, son debidas al daño oxidativo que sufren las biomoléculas y su acumulación durante el envejecimiento (Hulbert *et al.*, 2007 (Morris *et al.*, 2004; Starodubtseva, 2011 (Hale *et al.*, 2011). (Amberg *et al.*, 2012), y este estrés oxidativo sucede en las células inmunitarias al envejecer, no parecen afectarse de forma significativa los linfocitos T. Tampoco parece existir una relación entre los valores del módulo elástico en la edad adulta y la longevidad de los individuos. Si bien no existen muchos estudios acerca de cómo varían las propiedades biomecánicas al envejecer en las células T, algunos autores han descrito que sus membranas pierden fluidez con la edad, tanto en ratón como en humano, lo que parece relacionarse con el aumento de la polimerización de los filamentos F de actina que se produce en estas células en estado de reposo en individuos de edad avanzada (Rivnay *et*

*al.*, 1979; Rivnay *et al.*, 1980; Huber *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1992; Brock y Chrest, 1993; Garcia y Miller, 2011). Además, algunos trabajos han observado una alteración de la rigidez y la capacidad de deformación de las células T en algunas patologías como la diabetes (Perrault *et al.*, 2004) o la leucemia (Zheng *et al.*, 2015). Estos resultados no parecen concordar con los obtenidos en el presente trabajo, donde no se han hallado diferencias en la elasticidad de las células T peritoneales con la edad. No obstante, nuestro estudio supone la primera aproximación a este tipo de análisis en forma longitudinal. Parece necesario realizar futuras investigaciones con el fin de afinar el presente diseño experimental. De esta forma, aumentar el tamaño de la muestra (en este caso, el número de mediciones en las edades vieja y, particularmente, muy vieja fue muy bajo) o establecer de forma más ajustada las edades de muestreo (particularmente en la edad adulta, ya que en este estudio algunos de los individuos eran ya maduros) podrían ayudar a dilucidar si realmente la elasticidad de las células T peritoneales varía o no con la edad y si existe o no una relación entre ésta y la longevidad media. Así mismo, un estudio posterior más completo permitiría incluso analizar si dicho parámetro podría diferir en función de la subpoblación de linfocitos T peritoneales elegida (linfocitos T CD4+ y CD8+), ampliando el conocimiento sobre los cambios asociados con el envejecimiento de las propiedades biomecánicas de estas células. También podría resultar interesante comprobar si son los macrófagos o los linfocitos B los que se encuentran más afectados en este contexto al envejecer. De hecho, en un trabajo reciente hemos demostrado que son los macrófagos los que más estrés oxidativo, daño a biomoléculas y acúmulo de lipofuscina tienen de todas las células inmunitarias peritoneales al envejecer (Vida *et al.*, 2017).

### **5.1.2. Estudio longitudinal de las concentraciones de citoquinas intracelulares y secretadas por leucocitos en cultivo.**

Las citoquinas constituyen los principales mediadores de la interacción entre las células inmunitarias, estando implicadas en el desarrollo y la resolución de las respuestas inmunitarias, siendo también las responsables de múltiples funciones corporales. No obstante, con el envejecimiento se produce una alteración de la red de citoquinas, especialmente de aquellas producidas principalmente por los leucocitos, dándose un mayor perfil pro-inflamatorio. Es precisamente este hecho lo que contribuye al mantenimiento de un estrés inflamatorio crónico de bajo grado, conocido por el término

inglés de *inflammaging*, característico de los individuos al avanzar la edad (Franceschi *et al.*, 2000a) y que, consecuentemente, va a favorecer la pérdida de la salud en la vejez (Salvioli *et al.*, 2006).

Si bien los cambios en las concentraciones de citoquinas que suceden al envejecer han sido largamente investigados, la mayoría de los estudios se han centrado en analizar las concentraciones de estos mediadores a nivel plasmático o bien las secretadas por determinadas subpoblaciones leucocitarias *in vitro*. Así mismo, muy pocos trabajos han abordado cómo varían las concentraciones de citoquinas intracelulares en las células inmunitarias con el envejecimiento. Y ninguno, al menos hasta nuestro conocimiento, ha estudiado la variación de estos mediadores en un grupo de individuos a lo largo de su vida. Este estudio, por tanto, supone el primero en el que se han valorado en un mismo grupo de individuos (ratones) toda una serie de citoquinas (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6, IL10 e IL17) tanto contenidas en el interior de los leucocitos peritoneales como secretadas por estas células en cultivos. Y se ha llevado a cabo en el conjunto de las células inmunitarias, sin separarse en subpoblaciones, lo cual permite una mayor semejanza con lo que sucede *in vivo*, y tanto en estado basal como en presencia de dos estímulos mitogénicos, LPS y ConA. Además, las determinaciones se han realizado a lo largo de la vida de los animales, a los 2, 4, 9, 13 y 20 meses de edad.

Los resultados obtenidos en el estudio de las concentraciones de **citoquinas secretadas** por los leucocitos en cultivo indican que, en estado **basal**, en general, con el envejecimiento se produce un aumento de las concentraciones de citoquinas proinflamatorias, particularmente de IL1 $\beta$ , pero también de IL6, junto con un descenso de la de la citoquina antiinflamatoria IL10. Estos resultados corroboran la idea de que al envejecer se establece una inflamación crónica y de bajo grado, observada tanto en humano como en roedores, en la que se produce un aumento de citoquinas proinflamatorias acompañado de un descenso de las antiinflamatorias, destacándose la IL10 entre ellas (Mooradian *et al.*, 1991; De Martinis *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010b). De hecho, el aumento de citoquinas pro-inflamatorias se ha llegado a relacionar con una mayor morbilidad y mortalidad en la vejez, especialmente en el caso de la IL6 y el TNF $\alpha$  (Mooradian *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 1999; De Martinis *et al.*, 2006; Ealston *et al.*, 2009; Michaud *et al.*, 2013). Este proceso de *inflammaging* observado en los leucocitos peritoneales contribuiría al deterioro funcional asociado con la edad, o inmunosenescencia, manifestado por estas células (Arranz *et al.*,



2010a). Dado que la inmunosenescencia, con el estrés oxidativo e inflamatorio que subyace a la misma, se ha propuesto como un indicador de la velocidad de envejecimiento de cada individuo (De la Fuente y Miquel, 2009; De la Fuente, 2014), parece lógico pensar que esa mayor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias pueda relacionarse con un aumento de morbilidad y mortalidad.

Las citoquinas analizadas en situación basal nos estarían indicando el estado que se denomina de “inflamación estéril”, pues se liberan cuando no hay un patógeno al que se tenga que destruir mediante la liberación de compuestos inflamatorios (Franceschi *et al.*, 2000a; Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007; Rock *et al.*, 2010). Pero las citoquinas son más relevantes en el contexto de la respuesta a los agentes infecciosos, situación en la que las citoquinas pro-inflamatorias determinan la potencia, la eficacia y la duración de la inflamación que permite la destrucción de los mismos. Evidentemente, una vez destruido lo extraño se requiere la presencia de compuestos que limiten y resuelvan la inflamación. Aquí encontramos a la IL10 y otras citoquinas anti-inflamatorias, necesarias para que finalice la respuesta inflamatoria (Lio *et al.*, 2003). En el presente trabajo se observó como las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos peritoneales cultivados en **condiciones de estimulación**, en presencia de los mitógenos LPS y ConA, disminuyen con la edad. Estas condiciones de estimulación mimetizan *ex vivo* el comportamiento de las células inmunitarias ante un antígeno *in vivo*. Curiosamente en presencia de mitógenos disminuyen tanto las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6) como la cantidad de la citoquina anti-inflamatoria IL10. Estos datos apuntan a que los leucocitos con la edad pierden la capacidad para iniciar la respuesta de inflamación necesaria para eliminar a los patógenos, y se corresponden con los observados con otros autores, en los que células inmunitarias de individuos de edad avanzada enfrentadas a un estímulo, producen menores cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Renshaw *et al.*, 2002; van den Biggelaar *et al.*, 2004a; Boehmer *et al.*, 2005; Chelvarajan *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010b).

Con respecto a las **concentraciones de IL17 secretadas**, los resultados del presente subobjetivo muestran que éstas no se ven modificadas al avanzar la edad, ni en estado basal ni en presencia de los estímulos empleados. Aunque el papel de la IL17 aún no está del todo dilucidado, algunos estudios apuntan que esta citoquina aumenta

sus niveles con el envejecimiento fisiológico (De Angulo *et al.*, 2015) así como en determinadas condiciones patológicas, como infecciones víricas (Stout-Delgado *et al.*, 2009; Goldstein, 2010) o enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Csizar *et al.*, 2003; Tesar *et al.*, 2009; Berenbaum, 2013). No obstante, ningún estudio ha abordado cómo varían las concentraciones de esta citoquina en un estudio longitudinal, como en este caso, por lo que, dadas las controversias existentes, se debería profundizar a este respecto en futuras investigaciones.

En el presente subobjetivo, además, nos planteamos valorar las **concentraciones intracelulares** de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6 así como de la antiinflamatoria IL10, contenidas en el interior de los leucocitos peritoneales cultivados en estado de reposo y en presencia de LPS y ConA, en cuyos mismos sobrenadantes se valoró la secreción de dichas citoquinas. Este tipo de estudio longitudinal ha sido la primera vez que se ha llevado a cabo, por lo que no hay bibliografía directa de referencia. Con respecto a los leucocitos en **estado basal**, se observa que al avanzar la edad no hay cambios apreciables en las citoquinas pro-inflamatorias, salvo en la IL6, con valores elevados en los animales viejos con respecto a los adultos. Así mismo, la IL10 también aumenta en los animales de edades avanzadas. Por su parte, en **condiciones estimuladas** (en presencia de LPS y ConA), los leucocitos peritoneales presentan una disminución de la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , pero no en el caso de la IL-6, que aumenta. La IL10 también desciende en los animales viejos con respecto a los adultos. Muy pocos estudios han abordado cómo varían los niveles intracelulares de citoquinas en los leucocitos en la vejez, existiendo además gran cantidad de resultados contradictorios, fundamentalmente debida a las diferentes metodologías empleadas y al tipo de célula inmunitaria estudiado. Se ha observado que en estado de reposo, los monocitos y especialmente los linfocitos T de sangre periférica procedentes de individuos de edad avanzada (>62 años) manifiestan una mayor expresión de citoquinas pro-inflamatorias O'Mahony *et al.* (1998). Así mismo, otros autores han observado una mayor expresión intracelular de IL10 en monocitos en reposo de sujetos de edad avanzada (>65 años) con respecto a individuos jóvenes (Mohanty *et al.*, 2015). Ambos estudios, parecen corroborar, al menos en parte, los resultados obtenidos en el presente subobjetivo en los leucocitos peritoneales en estado basal. Así mismo, en condiciones de estimulación, dichos autores han observado que los mayores niveles tanto de citoquinas pro-inflamatorias como de la anti-

inflamatoria IL10 detectados en estado de reposo en las personas de edad avanzada, se mantienen aumentados tras la estimulación de dichas células (O'Mahony *et al.*, 1998; Mohanty *et al.*, 2015), lo cual no ocurre en nuestros resultados, con la excepción de la IL-6. No obstante, las diferencias entre dichos trabajos y el aquí expuesto son numerosas (diferentes especies, diferentes poblaciones de células inmunitarias estudiadas, presencia o no de otros tipos de leucocitos en el cultivo, diferentes estímulos empleados, metodologías de cuantificación distintas, etc.), lo que puede suponer una importante fuente de factores que originen las diferencias obtenidas. El descenso observado en la cantidad intracelular de las citoquinas pro-inflamatorias así como de IL10 en los leucocitos peritoneales de los ratones viejos bajo condiciones de estimulación, se corresponden con las menores concentraciones de dichas citoquinas detectadas en el sobrenadante de cultivo de los leucocitos en presencia de LPS y ConA. Esto podría indicar que la exposición constante de estas células a un ambiente de respuesta inflamatoria conforme avanza la edad (corroborado por los resultados observados en condiciones de reposo o basales), conllevaría un deterioro de los sistemas de producción, transporte intracelular y liberación de citoquinas. Esto implicaría una falta funcional en esas condiciones e que se hace necesaria una rápida secreción de citoquinas para responder adecuadamente a un antígeno, y que en nuestro diseño experimental se mimetiza por la adición al cultivo de LPS y ConA. Aunque han sido poco estudiados, se sabe que los procesos intracelular que permiten esa liberación de citoquinas, y que incluyen al sistema de endomembranas y al citoesqueleto, sufren alteraciones con la edad (Starodubtseva, 2011; Amberg *et al.*, 2012). Lógicamente tales procesos podrían estar modificados en las células inmunitarias peritoneales al avanzar la edad, lo que explicaría los resultados obtenidos. No obstante, nuestro trabajo supone tan sólo una aproximación en este campo, por lo que sería necesario realizar futuras investigaciones para conocer mejor cómo el envejecimiento modifica las concentraciones de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en estas células inmunitarias.

Los resultados del presente subobjetivo confirman que con el envejecimiento se produce una alteración de la red de citoquinas, estableciéndose una inflamación crónica o *inflammaging* a la que contribuyen de forma importante las células inmunitarias, que producen y secretan mediadores proinflamatorios en estado de reposo, desencadenando una inflamación estéril, en ausencia de estimulación antigénica. Además, los leucocitos en la vejez no son

capaces de secretar las citoquinas anti-inflamatorias, en este caso representadas por IL10, necesarias para controlar y resolver dicha respuesta, favoreciendo el mantenimiento de dicha inflamación. Esa “inflamación estéril”, al ser persistente, termina deteriorando la funcionalidad de las células inmunitarias y, en general de todo el organismo, favoreciendo la aparición y aumento en la severidad de toda una serie de patologías. Como prueba de esta inmunosenescencia, los leucocitos en los animales viejos en presencia de estímulos como el LPS y ConA, que mimetizarían la respuesta a los antígenos *in vivo*, son incapaces de producir y liberar unos niveles adecuados de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias lo que, *in vivo*, se traduciría en una incapacidad para iniciar respuestas inmunitarias satisfactorias. No obstante, este estudio, como ya se ha indicado, supone sólo una primera aproximación en este contexto, por lo que sería necesario realizar futuras investigaciones profundizando en la variación a lo largo de la edad de las concentraciones de citoquinas leucocitarias, más allá de las aquí determinadas, secretadas y especialmente intracelulares. Así mismo, dado que se han relacionado algunas de estas citoquinas con la esperanza de vida del individuo, un estudio más completo permitiría dilucidar si realmente esa relación se cumple, pudiendo proponer los valores de citoquinas, y las relaciones entre los mismos, como marcadores de velocidad de envejecimiento, esto es, de edad biológica y como predictores de longevidad.

### **5.2. PROFUNDIZACIÓN EN PARÁMETROS CONDUCTUALES E INMUNITARIOS EN RATONES PREMATURAMENTE ENVEJECIDOS (PAM).**

#### **5.2.1. Estudio conductual de PAM. Actividad física voluntaria y conductas de ansiedad.**

##### *5.2.1.1. Actividad física voluntaria*

Los resultados obtenidos del análisis de la actividad física voluntaria, determinada en la rueda de actividad (o *running wheel* en inglés), muestran que los PAM adultos recorrieron una mayor distancia y alcanzaron unas velocidades máxima y media mayores en relación a los NPAM adultos. Estos resultados indicarían que los PAM presentan una mayor actividad física voluntaria, esto es son más activos, con respecto a los NPAM. Si bien la rueda de actividad supone un instrumento de fácil uso y válido para determinar la actividad de los roedores (Sherwin, 1998), aún no existe un consenso claro acerca de los mecanismos que subyacen a la conducta que induce. Además,

factores como la cepa, la edad o el sexo pueden hacer variar de forma significativa la actividad física medida en este aparato (Goh y Ladiges, 2015). Es conocido el descenso que experimenta la actividad física al avanzar la edad tanto en humanos como en animales (Ingram, 2000; Milanovic *et al.*, 2013). Este hecho parece contradecir los resultados que hemos obtenido en los PAM, que son ratones prematuramente envejecidos. No obstante, algunos autores han postulado que un exceso de actividad física voluntaria en la rueda en roedores, como ocurre en este caso en los PAM, podría ser indicativo de una conducta repetitiva, casi obsesiva, de tipo estereotípico, que estaría manifestando una alteración conductual del individuo (Richter *et al.*, 2014). Así, el hecho de que los PAM muestren una excesiva actividad voluntaria con respecto a los NPAM en esta prueba podría ser el reflejo de los altos niveles de hiperreactividad al estrés y ansiedad que caracterizan a los PAM (Viveros *et al.*, 2001; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007).

### 5.2.1.2. Conductas de ansiedad

Con el fin de profundizar en la alteración conductual de los PAM, y particularmente en su mayor emocionalidad y ansiedad, se valoraron las conductas de anidación y enterramientos en PAM en comparación con NPAM.

Con respecto a los resultados obtenidos del estudio de la **conducta de anidación**, si bien no se observaron diferencias entre ambos grupos experimentales en cuanto a la puntuación del nido según la escala de Deacon, los PAM no fueron capaces de construir un nido perfecto (no alcanzaron la puntuación de 5 en la escala), mientras que los NPAM sí lo hicieron. Tampoco los PAM lograron perfeccionar o mejorar la estructura de su nido en el tiempo de duración de la prueba (72 h) en relación a los NPAM que sí fueron capaces de hacerlo. La construcción del nido es de vital importancia para la supervivencia de los roedores ya que estas estructuras les proporcionan cobijo frente a las amenazas ambientales, los depredadores o los competidores además de ayudar al mantenimiento de la temperatura corporal y al desarrollo de la prole, asegurando en último término el éxito reproductivo del individuo (Berry, 1970; Bult y Lynch, 1997; Latham y Mason, 2004; Deacon, 2006b; Hess *et al.*, 2008). Numerosos autores han demostrado que un deterioro de la capacidad del roedor para construir de forma adecuada un nido, obteniendo bajas puntuaciones en la escala de Deacon, podría estar relacionada con alteraciones que afectan a distintas áreas hipocampales (Deacon, 2012). Aunque en este

sentido los PAM al no mostrar puntuaciones bajas en la prueba no parecen tener alteradas dichas áreas del hipocampo, el hecho de que sean incapaces de construir un nido perfecto así como de perfeccionar la estructura de su nido en relación a los NPAM, sí indicaría un defecto en esta conducta esencial. Este deterioro podría relacionarse con su exacerbada reactividad al estrés y a sus mayores niveles de ansiedad (Viveros *et al.*, 2001; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Viveros *et al.*, 2007). Así mismo, algunos autores han postulado que deterioros sensoriomotores, de memoria, déficits en la conducta de planificación, apatía o depresión podrían subyacer a la alteración observada en esta conducta (Filali *et al.*, 2009; 2011; Wesson y Wilson, 2011). En este sentido, en los PAM se han detectado algunas de estas características. En concreto, resultados en vías de publicación de nuestro laboratorio apuntan a que los PAM en la edad adulta manifiestan un deterioro de la memoria de trabajo, que podría relacionarse con una alteración de la conducta de planificación, lo que apoyaría el hecho de que los PAM no sean capaces de perfeccionar la estructura de su nido.

Por otra parte, la mayoría de los roedores, incluyendo ratas y ratones, en respuesta a estímulos reales o potencialmente aversivos muestran una **conducta de enterramiento** como mecanismo de defensa frente a dicho estímulo (De Boer y Koolhaas, 2003). Pero también estos animales pueden mostrar esta conducta ante estímulos no aversivos, como la comida o las canicas (Terlecki *et al.*, 1979; Poling *et al.*, 1981; Broekkamp *et al.*, 1986). En base a esto, se desarrolló la prueba de las canicas, empleada en numerosos estudios para analizar la conducta de ansiedad o las conductas repetitivas en los ratones. Así, algunos autores han propuesto que una mayor conducta de enterramiento podría reflejar conductas obsesivo-compulsivas y, por tanto, una mayor ansiedad (Njung'e y Handley, 1991<sup>a</sup>; Gyertyán, 1995; Londei *et al.*, 1998; Masuda *et al.*, 2000; Deacon y Rawlins, 2005). De hecho, se ha comprobado que la administración de ansiolíticos reduce la conducta de enterramiento en los roedores (Broekkamp *et al.*, 1986; Njung'e y Handley, 1991<sup>a</sup>; Borsini *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en esta prueba, en el presente trabajo, muestran que los PAM mueven y entierran un mayor número de canicas, tanto en la condición “estándar” como en la condición “bizonal”, con respecto a los NPAM. Estos resultados, teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, indicarían que los PAM manifiestan unos mayores niveles de ansiedad que los NPAM. Se vuelve a corroborar resultados previos de nuestro grupo de investigación que demostraron como los PAM al someterse al laberinto en cruz elevado o el laberinto en T,

presentaban respuestas de ansiedad y de mayor emotividad que los NPAM (Viveros *et al.*, 2001).

Los resultados de este subobjetivo muestran que los PAM manifiestan mayores actividad física voluntaria y conducta de enterramiento así como un deterioro de la conducta de anidación con respecto a los NPAM, lo que corrobora la hiperreactividad y mayor ansiedad de estos animales. Dado que esa mayor ansiedad es una característica del envejecimiento (Vida *et al.* 2014), los datos obtenidos son un apoyo al valor de este modelo de envejecimiento prematuro.

### **5.2.2. Concentraciones de citoquinas secretadas por leucocitos de PAM en cultivo.**

En el presente subobjetivo se determinaron las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6, de la citoquina anti-inflamatoria IL10 y de las citoquinas IL2 e IL17 secretadas por los leucocitos peritoneales, de PAM y NPAM adultos, en cultivo, tanto en estado basal como en presencia de los estímulos mitogénicos LPS y ConA. Si bien algunas de estas citoquinas, como la IL-2,..., ya han sido valoradas en los sobrenadantes de los cultivos de leucocitos peritoneales de PAM y NPAM, en condiciones de estimulación con mitógenos (Guayerbas *et al.*, 2002a; Alvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a), el presente estudio es el primero en el que se han valorado todas las citoquinas mencionadas y de forma simultánea mediante técnicas de luminometría, y no sólo las secretadas bajo condiciones de estimulación sino también en estado basal.

Con respecto a las concentraciones de citoquinas secretadas por los leucocitos peritoneales en **estado basal** o de reposo, se observó en los PAM, respecto a los NPAM, mayores concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias, especialmente de IL-1 beta y de TNF-alfa, así como de IL17, no dándose ningún cambio en la cantidad de la citoquina anti-inflamatoria IL10. Estas mayores cantidades de mediadores inflamatorios, no contrarrestados por los anti-inflamatorios son coincidentes con la mayor inflamación estéril detectada en individuos cronológicamente viejos (Mooradian *et al.*, 1991; Franceschi *et al.*, 2000a; De Martinis *et al.*, 2006; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Rock *et al.*, 2010; Arranz *et al.*, 2010b) así como con los resultados ya comentados del estudio longitudinal del subobjetivo 1.2. de la presente Tesis.

Por su parte, en **condiciones de estimulación**, los leucocitos peritoneales de los PAM secretan, en general, menores concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias, de la citoquina anti-inflamatoria IL10 así como de la IL-2 y la IL17 en relación a los NPAM. De igual manera a lo sucedido en condiciones de reposo, estos resultados también concuerdan con los obtenidos por otros autores en individuos de edad avanzada (Renshaw *et al.*, 2002; Pawelec *et al.*, 2002; van den Biggelaar *et al.*, 2004a; Boehmer *et al.*, 2005; Chelvarajan *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2010b) y con los del estudio longitudinal del subobjetivo 1.2. de la presente Tesis.

Atendiendo a los niveles de la citoquina reguladora IL2 secretados por los leucocitos de PAM en respuesta a ConA, y que fueron menores que en los NPAM, los resultados son coincidentes con lo observado en individuos de edad avanzada, tanto ratones como humanos (Pawelec *et al.*, 2002; Arranz *et al.*, 2010b). Esta menor concentración del también denominado factor de crecimiento de las células T en respuesta a ConA, mitógeno que estimula de forma preferencial a los linfocitos T, subyacería a la menor capacidad de respuesta proliferativa de estas células que se ha comprobado sucede al avanzar la edad (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; De la Fuente *et al.*, 2008a; Arranz *et al.*, 2010a), y que también se ha observado en los linfocitos de PAM (Guayerbas *et al.*, 2002a; Perez-Alvarez *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006).

En vista a los resultados obtenidos en el presente subobjetivo, se confirma que los PAM, ya en la edad adulta, manifiestan una alteración de la red de citoquinas, esenciales para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario. Por una parte experimentan una inflamación estéril crónica de bajo grado (*inflammaging*), al igual que ocurre en los individuos cronológicamente viejos. Esta inflamación podría ser la base de la inmunosenescencia prematura característica de los PAM y que explicaría la menor esperanza de vida que presentan estos animales en comparación con los NPAM de su misma edad cronológica (Viveros *et al.*, 2001; Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Guayerbas *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; De la Fuente, 2010). Todo ello sigue confirmando la validez de este modelo de envejecimiento prematuro.



### **5.3. EFECTOS DEL AISLAMIENTO SOCIAL Y DE LA ANSIEDAD EN MODELOS MURINOS A DIFERENTES EDADES.**

La separación materna y la soledad o el aislamiento social, en especies sociales como la humana o los roedores, son considerados como un potente estrés psicológico que deteriora el funcionamiento del organismo y, particularmente de los sistemas reguladores y de la comunicación entre ellos. Los posibles efectos deletéreos de este tipo de situaciones estresantes psicológicas sobre el estado funcional de esos sistemas reguladores pueden darse en el individuo social en cualquiera de las etapas de su vida, si bien es en la infancia y especialmente en la vejez cuando resultan más perjudiciales, pudiendo actuar como aceleradores del proceso de senescencia. No obstante, las características propias de cada sujeto (edad, sexo, resiliencia, respuesta emocional al estrés, niveles de ansiedad) podrían modificar los efectos negativos, particularmente del aislamiento social o la soledad, sobre el estado de salud y la longevidad del individuo.

#### **5.3.1. Efectos de la separación materna sobre la función inmunitaria en ratas adultas machos y hembras.**

Los cuidados maternos, especialmente en los mamíferos, establecen un vínculo social fundamental entre la madre y el hijo, por lo que la interrupción de estos importantes lazos sociales supondría un estrés que conllevaría efectos negativos en la madre pero también en las crías. De hecho, padecer estrés psicológico en las primeras etapas de la vida se ha asociado con una mayor vulnerabilidad a desarrollar todo tipo de psicopatologías en etapas posteriores tales como depresión, ansiedad o psicosis (Penza *et al.*, 2003; Gutman y Nemeroff, 2003; Springer *et al.*, 2007; Faturi *et al.*, 2010). Además, los primeros años de vida resultan cruciales en el desarrollo de los sistemas reguladores, por lo que padecer estrés a edades tempranas podría afectar al desarrollo de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina con los consecuentes efectos deletéreos sobre la homeostasis y la salud (Neveu *et al.*, 1994; Suchecki y Tufik, 1997; Gutman y Nemeroff, 2002; Teunis *et al.*, 2002; Meagher *et al.*, 2010). La separación materna mimetiza en animales de experimentación la experiencia de enfrentarse a adversidades o situaciones psicológicamente estresantes en las primeras etapas de la vida. Si bien ésta no se ajusta de forma estricta a un protocolo de aislamiento social, sí supone un fuerte estrés psicológico para la cría, que pierde, aunque sea de manera momentánea, el lazo social más importante durante la lactancia y fase fundamental del desarrollo en los mamíferos: la unión materno-filial.

Por ello, la separación materna podría considerarse un modelo experimental de aislamiento social en la infancia.

En el presente subobjetivo, se llevó a cabo un protocolo de separación materna de larga duración que consistió en separar a las crías (tanto machos como hembras) de la madre durante el periodo de lactancia (21 días desde el nacimiento) 3 horas al día. Posteriormente, al alcanzar la edad adulta, se valoraron en los leucocitos esplénicos y tímicos de todos los individuos una serie de funciones inmunitarias como la quimiotaxis, la actividad citotóxica NK y la respuesta de proliferación tanto basal como en respuesta a los mitógenos LPS y ConA.

Los resultados han mostrado que este protocolo de separación materna de larga duración no indujo cambios, en la edad adulta, ni en el bazo ni en el timo, en las dos funciones de la inmunidad innata analizadas: la **quimiotaxis**, o capacidad de movilidad hacia el foco infeccioso, y la **actividad citotóxica NK**. Muy pocos estudios han abordado en roedores si, tras haber sufrido separación materna durante la lactancia (como es el caso de este diseño experimental), estas funciones inmunitarias se ven alterada en la edad adulta. Únicamente, Nakamura *et al.* (2011) observaron una menor actividad NK en ratas adultas sometidas a un protocolo de separación materna similar al nuestro, pero sólo tras aplicar a éstas un estrés por inmovilización crónico. No obstante, en el presente diseño experimental, los animales no se sometieron a ningún estrés previamente a las valoraciones inmunitarias, lo que podría explicar por qué no se observan cambios en dichas funciones. Por el contrario, el protocolo de separación materna de larga duración sí indujo cambios en la **capacidad de proliferación** de los leucocitos en la edad adulta, destacándose una alterada respuesta proliferativa de dichas células tanto en estado basal como frente a los mitógenos LPS y ConA, lo cual mimetiza su respuesta *in vivo* a los antígenos. Así, en presencia de ambos estímulos, los leucocitos esplénicos proliferaron menos en las ratas de ambos sexos, mientras que en el timo, las hembras sometidas a separación materna fueron las que mostraron una notable merma de su capacidad proliferativa en respuesta a los mitógenos. Estos resultados se corroboran con los obtenidos en otros trabajos, en los que se ha descrito un deterioro de la capacidad de proliferación de los linfocitos de sangre periférica frente al mitógeno PHA en ratas sometidas a separación materna en la adolescencia (40 días de edad) (Ackerman *et al.*, 1988) así como una menor capacidad proliferativa de

linfocitos T y B en primates no humanos, en su infancia y juventud, cuando fueron criados separados de la madre (Laudenslager *et al.*, 1982; Lubach *et al.*, 1995). Por todo ello, parece que la función inmunitaria más sensible a los efectos de la separación materna sería la capacidad de proliferación de los leucocitos, cuya alteración podría mantenerse tiempo después de realizarse la separación materna y se detectaría sin necesidad de someter al individuo a ningún factor estresante.

Hasta la fecha, el estudio más completo acerca de los efectos a largo plazo de la separación materna en la función inmunitaria, se llevó a cabo por nuestro grupo de investigación en un trabajo de colaboración realizado en ratas. En este caso, el protocolo de separación fue de 24 horas de duración (iniciado en el día post-natal 9), pero sus efectos inmunosupresores se alargaron hasta la edad adulta. De hecho, las ratas sometidas a este protocolo de separación manifestaron una menor actividad citotóxica NK en los leucocitos esplénicos y tímicos, así como una menor respuesta proliferativa a los mitógenos LPS y ConA en el timo, que fue significativa en el caso de las hembras (De la Fuente *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2015). Es evidente que los efectos deletéreos a largo plazo sobre la inmunidad del protocolo de separación materna de 24 h de duración son más generalizados, afectando a casi todas las funciones inmunitarias que se analizaron, mientras que el protocolo de separación materna realizado en la presente Tesis, de 3 h diarias durante su periodo de lactancia sólo manifestó efecto deteriorando la capacidad proliferativa. Estas diferencias pueden ser debidas al tiempo de separación sufrido por las crías, que tendría un impacto diferente en la funcionalidad del sistema inmunitario y de los otros sistemas reguladores, esto es nervioso y endocrino. Así, la separación de 24 h en el día post-natal 9 ocurre en un periodo de desarrollo muy importante, es un periodo largo de separación y supone para las crías un fuerte estrés psicológico. Por un lado, la pérdida de los cuidados maternos induciría un aumento en los niveles de glucocorticoides que podrían subyacer al deterioro de importantes regiones cerebrales. Además, la falta de alimentación en las crías durante esas 24 horas conllevaría la pérdida del pico de leptina, cuyas acciones neurotróficas parecen necesarias para un adecuado desarrollo cerebral (Marco *et al.*, 2015). Todo ello se traduciría en un grave deterioro conductual, metabólico e incluso inmunitario (dada la existencia de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina) observado en estos animales, incluso en la edad adulta. Por el contrario, el protocolo de separación materna a lo

largo de las 3 semanas de lactancia, pero de tan sólo 3 h al día, podría suponer un estrés psicológico menos agresivo que en el caso anterior. De hecho, aunque algunos autores han observado un deterioro conductual y cognitivo en ratas adultas sometidos a una separación materna de 3 horas diarias durante la lactancia, debido a un aumento de los glucocorticoides y a un fallo en el mecanismo de retroalimentación negativa sobre el hipocampo mediado por sus receptores, pero estos efectos sólo son visibles en respuesta a estímulos estresantes (Aisa *et al.*, 2007; Aisa *et al.*, 2008). En este sentido, existen datos que indican que individuos estresados de forma crónica, incluyendo animales sometidos a separación materna de larga duración, sólo manifiestan alteraciones inmunitarias tras ser expuestos a un estrés agudo o crónico (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984b; Kiecolt-Glaser *et al.*, 1986; Esterling *et al.*, 1994; Esterling *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2011). En nuestro caso, los animales no se expusieron a ninguna situación estresante previamente a las valoraciones inmunológicas por lo que ésta podría ser la causa por la que el deterioro inmunitario mostrado por los individuos en la edad adulta sea sólo parcial, apareciendo preservadas funciones como la quimiotaxis y la actividad NK, aunque sí se encuentre alterada la capacidad proliferativa de los leucocitos. De hecho, esta actividad proliferativa es una de las funciones más sensibles a situaciones que generan estrés, como la actividad física, la cual en determinados protocolos que no afectan a la inmunidad innata sí deterioran la respuesta proliferativa (Ferrández, 1994).

Por su parte, los resultados del presente subobjetivo también manifiestan que las consecuencias inmunitarias a largo plazo del protocolo de separación materna que se ha utilizado, dependen del sexo. Así, son las hembras que sufren este estrés psicológico durante la lactancia las que muestran un deterioro más general de su capacidad proliferativa, dado que ésta es menor con respecto a las hembras control tanto en el bazo como en el timo. Mientras que sólo los leucocitos esplénicos de los machos separados manifiestan una menor proliferación en respuesta a los mitógenos empleados (LPS y ConA). Este hecho apuntaría a que las hembras parecen más vulnerables que los machos a este estrés psicológico temprano. Si bien son muchos estudios los que postulan que las hembras son más resilientes o muestran una mejor capacidad de adaptación que los machos ante el estrés (ter Horst *et al.*, 2012), éste hecho dependería del tipo de estrés utilizado y su duración. Así, ratas hembra ante un factor estresante medio de tipo crónico (*Chronic mild stress* o CMS en inglés), que supone

la exposición al individuo a situaciones estresantes de bajo grado con determinada frecuencia, serían más vulnerables a los efectos de dicho estrés pero responderían mejor ante nuevos estreses que los machos (Dalla *et al.*, 2005). También, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo se comprobó que las hembras eran más sensibles al estrés que suponía la retirada del enriquecimiento ambiental, presentando una menor proliferación leucocitaria que los machos (Arranz *et al.*, 2011). A esta diferente respuesta sexual al estrés subyacerían no sólo el efecto de las hormonas sexuales sino también la diferente regulación sobre la actividad del eje HHA existente entre machos y hembras (ter Hoerst *et al.*, 2012). El tipo de estrés padecido durante la lactancia por las crías durante el protocolo de separación materna aquí estudiado, podría asemejarse al estrés medio de tipo crónico anteriormente mencionado, lo que explicaría por qué las hembras que han padecido separación materna muestran en la edad adulta un mayor deterioro de la capacidad proliferativa que los machos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que separar a las crías de rata de su madre diariamente durante 3 semanas unas pocas horas supone un estrés psicológico para las mismas que conlleva un deterioro del sistema inmunitario. No obstante, carecemos de datos sobre si dicho deterioro se manifiesta en edades más tempranas y si es así, si es o no generalizado. Además, este declive de la función inmunitaria no es tan generalizado como el observado en otros protocolos de separación materna más agresivos, como es el caso de la separación de 24 h ya comentado. Esta diferencia podría radicar en la frecuencia a la que las crías son sometidas a dicho estrés psicológico. Así, la separación diaria de la madre durante 3 h a lo largo de la lactancia podría haber permitido a los individuos desarrollar mecanismos de adaptación a dicha situación estresante que, finalmente, posibilitaría cierta recuperación de sus funciones inmunitarias, al menos de las de inmunidad innata, en un estado basal o de reposo. Habría que saber, no obstante, si estos animales muestran un declive más general de su función inmunitaria tras ser sometidos a un estrés. Por otro lado, las alteraciones en la función inmunitaria inducidas por el protocolo de separación materna observadas aquí, así como el deterioro conductual y cognitivo demostrado en otros estudios, recuerdan a lo que ocurre en el envejecimiento, por lo que padecer estrés psicológico en las primeras etapas de la vida podría generar un envejecimiento prematuro en la edad adulta, mermando la capacidad para mantener un adecuado equilibrio homeocinético y, por tanto, un buen estado de salud.

### **5.3.2. Efecto de la respuesta de ansiedad al aislamiento social sobre parámetros de función inmunitaria y de estrés oxidativo en ratas viejas macho.**

Para las especies sociales, vivir en grupo es fundamental para la supervivencia y el éxito reproductivo del individuo ya que dichas estructuras protegen a los sujetos que las conforman ante las amenazas del ambiente que los rodea. Por tanto, el aislamiento social o la soledad suponen un estrés emocional muy potente que deterioraría el funcionamiento de los sistemas reguladores y de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina, llevando a la pérdida de la homeostasis y favoreciendo la aparición de enfermedad. De hecho, el aislamiento social y la soledad son factores de riesgo de morbilidad y mortalidad (House *et al.*, 1988; Holt-Lunstad *et al.*, 2010; Pantell *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta la larga esperanza de vida del ser humano junto con la dificultad para determinar cuándo un individuo se siente solo (la soledad es un sentimiento subjetivo), desarrollar modelos animales de aislamiento social en animales sociales como los roedores es de gran importancia para intentar conocer los mecanismos subyacentes, así como los posibles factores que pueden modular la respuesta individual a dicho estrés psicológico. Así mismo, en la vejez aumenta la vulnerabilidad a sufrir aislamiento, por lo que padecerlo en las últimas etapas de la vida podría acelerar el proceso de senescencia, agravando el estado de salud del individuo.

Aunque muchos estudios han demostrado que el aislamiento social y la ansiedad deterioran el funcionamiento del sistema inmunitario y a pesar de que es sabido que ambos factores, aislamiento y ansiedad, están relacionados, el diseño llevado a cabo en el presente subobjetivo representa el primero, al menos hasta nuestro conocimiento, en el que se aborda cómo la respuesta de ansiedad del individuo ante un aislamiento social puede modular el deterioro inmunitario asociado al mismo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el protocolo de aislamiento social induce un deterioro de la mayoría de las funciones inmunitarias analizadas, de forma que los leucocitos esplénicos de las ratas aisladas mostraron una menor quimiotaxis, una reducida actividad citotóxica NK y una menor capacidad proliferativa frente al mitógeno LPS con respecto a los de las ratas que convivían en pareja. Además, este deterioro en la inmunidad es más notable en aquellos animales aislados que responden con altos niveles de ansiedad al protocolo de aislamiento social.

Con respecto a la **quimiotaxis**, ésta constituye una importante función en la respuesta inmunitaria dado que supone la capacidad de movilidad de los leucocitos para dirigirse hacia el foco de inflamación y así poder destruir patógenos. A pesar de dicha importancia, pocos estudios han abordado cómo el aislamiento social, y en general el estrés psicológico, afecta esta capacidad de migración de las células inmunitarias. Los resultados del presente subobjetivo muestran que los leucocitos esplénicos de los individuos aislados, independientemente de sus niveles de ansiedad, manifiestan una menor capacidad de quimiotaxis. Ésta observación se corresponde con las obtenidas por otros autores, que detectaron una menor movilización por parte de las células inmunitarias de sangre periférica hacia los tejidos en individuos sometidos a estrés crónico (Dhabhar and McEwen, 1997; Dhabhar, 2013). No obstante, otros trabajos sólo han encontrado una menor quimiotaxis en sujetos estresados de forma crónica tras ser expuestos a un estrés agudo (Redwine *et al.*, 2004). De hecho, los cambios que suceden durante la respuesta al estrés en las concentraciones de las hormonas del estrés, los glucocorticoides y las catecolaminas, inducen cambios en la inmunidad (Costa-Pinto y Palermo-Neto, 2010). Y es más, dichos cambios inducidos por estas hormonas sobre la función inmunitaria no afectan en igual modo a las respuestas inmunitarias innata y adquirida bajo condiciones estresantes, incluyéndose el aislamiento social (Ortega *et al.*, 1997; 2000c; 2007; Cruces *et al.*, 2014). En este sentido, con el envejecimiento, proceso en el que se produce una incapacidad para responder a situaciones estresantes, algunas funciones inmunitarias se deterioran debido a una inadecuada respuesta a las hormonas del estrés, incluyéndose las catecolaminas (Ortega *et al.*, 2000b; 2000c). Por lo tanto, y a pesar de no tener datos que lo apoyen, los leucocitos esplénicos de los animales aislados socialmente del presente trabajo podrían tener un respuesta deficiente a las catecolaminas, lo que contribuiría a la menor capacidad de movilidad hacia el foco infeccioso que manifiestan. No obstante, teniendo en cuenta las controversias halladas en la literatura a este respecto, se hace necesario realizar futuros estudios para determinar el efecto del estrés psicológico crónico y, particularmente, del aislamiento social sobre la quimiotaxis de las células inmunitarias así como los mecanismos subyacentes al mismo.

Por su parte, la **actividad citotóxica NK**, que representa una defensa esencial ante infecciones víricas y procesos neoplásicos, es menor en los leucocitos esplénicos de los animales aislados en relación

a los agrupados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los que se ha observado que esta función se ve deteriorada en humanos que sufren soledad (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; 1984b) y en roedores aislados socialmente (Wu *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2009b). Además, se ha propuesto que el aislamiento social crónico podría promover una bajada de la concentración de catecolaminas en el bazo (Gavrilovic *et al.*, 2010), que contribuiría a la pérdida de funcionalidad de las células NK asociada con este tipo de estrés psicológico (Won y Lin, 1989).

El protocolo de aislamiento social también afecta a la **capacidad de proliferación** de los leucocitos esplénicos en respuesta a mitógenos. Así, las ratas aisladas mostraron una menor capacidad proliferativa en presencia de LPS con respecto a los animales estabulados en pareja. Teniendo en cuenta que este mitógeno estimula de forma más específica a los linfocitos B, que juegan un papel fundamental en la inmunidad humoral, estos resultados indicarían que el aislamiento induce un deterioro funcional de estas células, lo cual concuerda con lo observado por otros autores (Wu *et al.*, 2000). Además, Cole *et al.*, (2007; 2011) demostraron que los leucocitos de sangre periférica de personas que se sentían solas mostraban un perfil de expresión génica diferente pro-inflamatorio, viéndose especialmente alterados genes involucrados en el proceso de maduración de los linfocitos B. Este hallazgo podría ser una de las razones que subyacen a la respuesta de proliferación al LPS deteriorada que se observa en los individuos aislados en el presente estudio.

Teniendo en cuenta la relación existente entre el aislamiento social y la ansiedad y que ésta última puede ser un importante factor modulador de las respuestas a situaciones estresantes, tras el protocolo de aislamiento y previamente a las valoraciones inmunitarias, todas las ratas del estudio se sometieron al laberinto en cruz elevado para determinar sus niveles de ansiedad. Los resultados obtenidos mostraron que los animales aislados permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del aparato, esto es mostraban mayores niveles de ansiedad, con respecto a los individuos estabulados en grupo. Además, también se obtuvieron diferencias en los niveles de ansiedad dentro de las ratas aisladas, existiendo individuos que manifestaban bajos niveles de ansiedad (permaneciendo más tiempo en los brazos abiertos del aparato) mientras que otros eran significativamente más ansiosos. De hecho, estos animales aislados



más ansiosos presentaron un deterioro más marcado de las funciones inmunitarias analizadas, mostrando los menores niveles de quimiotaxis, actividad citotóxica NK y proliferación en respuesta al LPS de todos los grupos del estudio. Por tanto, tener altos niveles de ansiedad induciría una mayor inmunosupresión, lo que se ha observado previamente en roedores (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009a; Vida y De la Fuente, 2013) así como en humanos (Arranz *et al.*, 2007; 2009a). Por tanto, aunque los resultados obtenidos en el presente subobjetivo muestran que el aislamiento social deteriora la mayoría de las funciones analizadas en los leucocitos esplénicos, otros de los parámetros analizados como la respuesta proliferativa al mitógeno ConA y las concentraciones de la citoquina antiinflamatoria IL10 y de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  secretadas por los leucocitos en cultivo, parecen estar afectados sólo en las ratas aisladas más ansiosas y no en las aisladas con menores niveles de ansiedad.

El mitógeno ConA estimula de forma más específica a los linfocitos T. Aunque esta subpoblación leucocitaria parece menos sensible a la soledad, a nivel de expresión génica, que otras células inmunitarias (Cole *et al.*, 2011), muchos estudios han demostrado que tanto la soledad como el aislamiento social reduce la **respuesta proliferativa** de las células T a diversos mitógenos, incluyendo **ConA** (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984b; Lu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). No obstante, nuestros resultados indican que sólo los leucocitos esplénicos de las ratas aisladas con altos niveles de ansiedad manifestaron una menor proliferación en presencia de este mitógeno respecto a los de los animales estabulados por pareja e incluso en relación a los animales aislados con menos ansiedad. En este sentido, algunos autores han observado en roedores con altos niveles de ansiedad una deficiente respuesta por parte de los leucocitos peritoneales a la ConA (Guayerbas *et al.*, 2002a), pero también por parte de los leucocitos esplénicos y de otros órganos inmunocompetentes (Guayerbas *et al.*, 2002a). De forma similar, las concentraciones de la **citoquina anti-inflamatoria IL10** secretada por los leucocitos esplénicos en presencia de LPS y ConA son menores únicamente en los animales aislados más ansiosos. Estos resultados podrían corresponderse con otros estudios en los que los niveles de esta citoquina también están alterados en individuos que sufren trastorno generalizado de ansiedad (Vieira *et al.*, 2010). Así mismo, la secreción de la **citoquina pro-inflamatoria TNF $\alpha$**  en respuesta a LPS fue significativamente menor en los cultivos de leucocitos de bazo de

las ratas aisladas con altos niveles de ansiedad. Inicialmente, este resultado parecería contradecir el efecto proinflamatorio inducido por el aislamiento social, la soledad y la ansiedad previamente descrito por numerosos autores (Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Hackett *et al.*, 2012; Jaremka *et al.*, 2013; Volgelzangs *et al.*, 2013; Vida *et al.*, 2014), pero no es así. De hecho, esta menor liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células inmunitarias en respuesta a estímulos mitogénicos ya se ha observado en la vejez (Arranz *et al.*, 2010b) y en los resultados del estudio longitudinal del subjetivo 1.2. de la presente Tesis. En las ratas aisladas más ansiosas podría desencadenarse una inflamación crónica en estado basal con una elevada secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Esta situación de inflamación estéril supondría un deterioro de la respuesta de estas células ante un estímulo como es el LPS, situación en la que es necesaria una cierta secreción de citoquinas pro-inflamatorias para permitir la destrucción del patógeno. Esto se ha comprobado en leucocitos de individuos al envejecer (Arranz *et al.*, 2010b) o con envejecimiento prematuro mostrando altos niveles de ansiedad como los PAM (resultados del subobjetivo 2.2. de la presente tesis). Por consiguiente, las menores concentraciones de IL10 así como el deterioro en la secreción de TNF $\alpha$  por parte de los leucocitos cultivados en condiciones de estimulación en las ratas aisladas más ansiosas, contribuirían a la alteración de la inmunidad manifestada por estos individuos que, finalmente, comprometería la capacidad de los animales para defenderse ante posibles infecciones, tanto víricas como bacterianas, y frente a procesos neoplásicos.

Teniendo en cuenta que son los animales aislados más ansiosos los que manifiestan un deterioro más generalizado y severo en las funciones inmunitarias analizadas, se podría decir que una incapacidad de adaptación a un estrés psicológico, como lo es el responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento social, provocaría un inmunosupresión generalizada.

Por su parte, se conoce la existencia de una relación entre la inflamación y la oxidación (Kulinsky, 2007; De la Fuente y Miquel, 2009; Vida *et al.*, 2014). Además, el estrés psicológico de tipo crónico conlleva el establecimiento de una inflamación de bajo grado (Miller *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2007), que podría subyacer a los efectos deletéreos de éste sobre la salud. En este sentido, el aislamiento social, la soledad y la ansiedad fomentarían el mantenimiento de un estrés inflamatorio y oxidativo que conllevaría la aparición de enfermedades.

Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo respecto al estudio de algunos compuestos antioxidantes y pro-oxidantes indican que responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento induciría una alteración en el estado redox del bazo. Así, sólo las ratas aisladas más ansiosas manifestaron en el bazo una menor actividad de la enzima antioxidante **GPx**, encargada de la oxidación del antioxidante glutatión, así como una mayor actividad de la enzima pro-oxidante **XO**, que como consecuencia de su acción genera ROS. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en estudios previos en los que se demuestra la existencia de una relación directa entre la ansiedad y una mayor oxidación (Bouayed *et al.*, 2009; Hovatta *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2014). Concretamente, ratones con elevados niveles de ansiedad manifiestan un mayor estrés oxidativo en comparación con los congéneres menos ansiosos (Alvarado *et al.*, 2006b; Viveros *et al.*, 2007; Rammal *et al.*, 2008).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran que el aislamiento social *per se* deteriora toda una serie de funciones inmunitarias, que subyacerían a la mayor vulnerabilidad a las infecciones y enfermedades de tipo inflamatorio, como enfermedades neuroinflamatorias, procesos tumorigénicos o patologías cardiovasculares, mostrada por animales aislados socialmente e individuos que se sienten solos (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; Glaser *et al.*, 1985; House *et al.*, 1988; Cacioppo and Hawkley, 2003; Hawkley *et al.*, 2006; Kroenke *et al.*, 2006; Karelina *et al.*, 2011; Jaremka *et al.*, 2013). Así mismo, estos resultados nos permiten postular que responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento social conlleva un aumento del estrés oxidativo e inflamatorio que subyacería a la inmunosupresión más severa y generalizada mostrada por estos individuos no sólo con respecto a los animales estabulados por parejas sino también en relación a las ratas aisladas menos ansiosas. Teniendo en cuenta que la mayoría de los parámetros inmunitarios analizados en el presente subobjetivo son considerados buenos marcadores de salud y predictores de longevidad (De la Fuente, 2008a; Martinez de Toda *et al.*, 2016), una respuesta más ansiosa al aislamiento social supondría un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad de lo que ya *per se* representa el aislamiento social y la ansiedad por separado, particularmente en la vejez, pudiendo acelerar el proceso de envejecimiento. Por tanto, estos resultados sugieren que el efecto negativo o deletéreo del aislamiento social y la soledad sobre la inmunidad dependerían de forma significativa del estado emocional del individuo.

### 5.3.3. Efectos del aislamiento y la ansiedad sobre la función inmunitaria y la longevidad media en ratones viejos.

En el presente subobjetivo nos propusimos profundizar en los efectos negativos del aislamiento social sobre toda una serie de funciones inmunitarias, propuestas como marcadores de edad biológica, es decir de la velocidad a la que el envejecimiento sucede, así como predictores de longevidad (De la Fuente, 2008a; Martínez de Toda *et al.*, 2016). Así mismo, atendiendo a los resultados obtenidos en el anterior subobjetivo (3.2.), en los que responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento indujo una inmunosupresión más generalizada y severa, así como conociendo que la ansiedad *per se* induce alteraciones en las respuestas inmunitarias (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2007; 2009a; Vida y De la Fuente, 2013; Vida *et al.*, 2014), también se determinó si tener altos niveles de ansiedad modularía la funcionalidad de los leucocitos no sólo en los ratones viejos aislados sino también en los agrupados, no sometidos a ningún estrés psicológico. Los resultados muestran que el aislamiento, en general, deteriora algunas de las funciones inmunitarias estudiadas. No obstante, son los ratones viejos aislados con altos niveles de ansiedad los que muestran el mayor deterioro inmunitario, dado que sufren una alteración en prácticamente todas las funciones analizadas en los leucocitos peritoneales. Así mismo, los animales agrupados con altos niveles de ansiedad también manifiestan cierto declive en algunos de los parámetros que se han determinado.

En primer lugar, previamente a las valoraciones inmunitarias, todos los individuos del estudio (tanto aislados como agrupados) se sometieron al “laberinto en cruz elevado” para poder subdividirlos en animales con bajos o altos niveles de ansiedad. En los resultados obtenidos en dicha prueba se observa, que tanto los animales agrupados como los aislados, mostraron, en conjunto, los mismos niveles de ansiedad, valorados como el porcentaje de tiempo en brazos abiertos. Estos resultados podrían parecer contradictorios (incluso en comparación con los observados en las ratas macho del anterior apartado del presente objetivo), dado que se ha asociado con el aislamiento social un aumento de la conducta de ansiedad (Kwak *et al.*, 2009). Sin embargo, ésta ausencia de diferencias entre los ratones aislados y agrupados en relación a la ansiedad es debida a que la respuesta de ansiedad ante el “laberinto en cruz elevado” dentro de los animales sometidos a aislamiento social difiere de forma significativa.

Así, si bien los animales aislados clasificados de alta ansiedad fueron los más ansiosos en relación al resto de grupos experimentales (con un % muy bajo de tiempo en brazos abiertos), sus compañeros aislados menos ansiosos manifestaron una mínima ansiedad (con el mayor tiempo en brazos abiertos de todos los grupos experimentales). En este sentido, algunos autores han propuesto que si bien las ratas hembras parecen más vulnerables a los efectos de un estrés crónico, responderían mejor al enfrentarse a situaciones estresantes novedosas, como pueden ser las pruebas conductuales (Dalla *et al.*, 2005). Este hallazgo podría explicar por qué los ratones hembras aisladas de baja ansiedad del presente subobjetivo, aunque están sometidas a un estrés psicológico crónico por encontrarse aisladas socialmente, responderían mejor al enfrentarse al laberinto que sus compañeras aisladas más ansiosas. Es posible que en esos animales el aislamiento haya generado una mejor resiliencia.

En relación a las **funciones** valoradas en los **macrófagos peritoneales**, se observa que el aislamiento induce una alteración de la funcionalidad de estas células. En concreto, los ratones viejos aislados mostraron una menor **capacidad de quimiotaxis** con respecto a los que viven agrupados. Estos resultados apoyan a los obtenidos en el subobjetivo 3.2. de la presente Tesis, en el que las ratas macho viejas sometidas a aislamiento mostraban una menor quimiotaxis con respecto a las estabuladas por parejas. Lamentablemente, como ya se ha mencionado anteriormente, no existen referencias bibliográficas directas acerca de cómo el aislamiento social afecta a la movilidad de las células inmunitarias hacia el foco de inflamación. De hecho, incluso los efectos del estrés crónico (que se podría asemejar a la situación a la que se enfrentan los individuos aislados) sobre esta función inmunitaria son contradictorios. Así, algunos autores han observado que el estrés crónico induciría una menor movilización de los leucocitos desde el torrente circulatorio hacia los tejidos (Dhabhar and McEwen, 1997; Dhabhar, 2013), lo cual concordaría con los resultados aquí obtenidos, mientras que otros han detectado que la quimiotaxis se halla mermada en individuos crónicamente estresados sólo tras la exposición a un estrés agudo (Redwine *et al.*, 2004). Así mismo, y al igual que se postuló en el anterior subobjetivo, la capacidad quimiotáctica de los leucocitos, incluyendo los macrófagos, se podría ver reducida en los individuos aislados debido a una respuesta deficiente de los mismos a las hormonas del estrés, como son los glucocorticoides y las catecolaminas, cuyos niveles se alteran bajo condiciones de

aislamiento. En el caso concreto de las catecolaminas, se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina en ratas aisladas socialmente (Gavrilovic *et al.*, 2010) que, en principio, potenciarían la capacidad funcional de las células de la inmunidad innata, como son los macrófagos. No obstante, una deficiente respuesta por parte de los macrófagos a las catecolaminas, lo cual también se ha observado en el envejecimiento (Ortega *et al.*, 2000b; 2000c), podría subyacer a su menor capacidad de migrar hacia el foco inflamatorio observada en los ratones aislados en relación a los que viven agrupados en el presente estudio. Si bien no poseemos datos que puedan confirmarnos esta hipótesis, futuros estudios podrían ahondar en esta cuestión, analizando la respuesta funcional de los macrófagos de los individuos aislados socialmente a las catecolaminas. Además, en los resultados obtenidos se observa que responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento social agravaría el deterioro funcional de los macrófagos, dado que dichas células procedentes de los ratones aislados con altos niveles de ansiedad son los que muestran la menor capacidad de movilidad hacia el foco de infección. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que la capacidad quimiotáctica de los fagocitos, macrófagos y neutrófilos, se halla reducida en ratones y humanos con elevados niveles de ansiedad (Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2002b; Guayerbas *et al.*, 2004; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Strewe *et al.*, 2015). Sin embargo, en los ratones agrupados con altos niveles de ansiedad, la capacidad de quimiotaxis de los macrófagos es similar a la mostrada por los agrupados menos ansiosos por lo que, en estos animales, la ansiedad no parece ejercer el efecto negativo sobre la funcionalidad de los estas células inmunitarias. Por tanto, el aislamiento y particularmente el responder con ansiedad al mismo parecen ser más determinantes en la alteración de la funcionalidad de los macrófagos peritoneales que la ansiedad *per se* en los ratones viejos.

Con respecto a las **funciones de linfocitos peritoneales** analizadas, se observa que los ratones viejos aislados muestran una menor **capacidad proliferativa en respuesta a los mitógenos** LPS y ConA. Dado que el LPS estimula de forma preferencial a los linfocitos B y el mitógeno ConA a los linfocitos T, estos resultados indicarían que el aislamiento social afecta a la capacidad de respuesta a los antígenos, mimetizados en este estudio por la adición al cultivo de los mencionados mitógenos, de ambas subpoblaciones de linfocitos. Como ya se ha comentado, Cole *et al.*, (2007, 2011) relacionaron la soledad con un perfil genético de tipo pro-inflamatorio, que se expresaría

fundamentalmente en las APC y los linfocitos B de sangre periférica. Esto podría explicar por qué los linfocitos B muestran ese deterioro en la proliferación en respuesta a LPS en los animales aislados, lo cual concuerda con lo observado por otros autores (Wu et al 2000) así como con los resultados obtenidos en el subobjetivo 3.2. de la presente Tesis. Además, las células T para su correcto funcionamiento, necesitan de la colaboración de las APC y los linfocitos B. Dado que el aislamiento social parece deteriorar las capacidades funcionales de las células B, la cooperación entre ambas subpoblaciones de linfocitos se vería también afectada. Esto apoyaría que en los presentes resultados los linfocitos T peritoneales de los animales aislados muestren una menor capacidad proliferativa en respuesta a ConA. Este deterioro de la respuesta de proliferación a mitógenos, incluyendo a la ConA, por parte de las células T también se ha demostrado en otros trabajos anteriores (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984b; Lu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). Además, el presente protocolo de aislamiento social merma de tal manera la capacidad linfoproliferativa en respuesta a mitógenos, que dicho deterioro es similar independientemente de los niveles de ansiedad mostrado por los animales. Por ello, tanto los ratones aislados menos ansiosos como los más ansiosos manifiestan en igual manera una menor proliferación en presencia a LPS y ConA. No obstante, en los ratones agrupados y, por tanto no sometidos a ningún tipo de estrés psicológico, la ansiedad sí induce cambios en la linfoproliferación de los leucocitos peritoneales. Así, las células inmunitarias de los animales agrupados más ansiosos manifestaron una capacidad proliferativa en respuesta a LPS y ConA significativamente menor que la mostrada por los ratones agrupados con bajos niveles de ansiedad, siendo además similares los valores de proliferación a los observados en los animales aislados. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en otros estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación, en los que leucocitos peritoneales o procedentes de órganos inmunocompetentes de ratones con altos niveles de ansiedad manifiestan una menor respuesta proliferativa a los mitógenos aquí utilizados (Guayerbas *et al.*, 2002a; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013). También, los linfocitos de sangre periférica de personas con patologías relacionadas con la ansiedad han mostrado esa menor proliferación (Arranz *et al.*, 2007; 2009a). Por otro lado, los resultados del presente subobjetivo muestran que el aislamiento social, en general, no altera ni la **capacidad quimiotáctica** ni la **proliferación basal** o en estado de reposo de los linfocitos peritoneales. No obstante, esta ausencia de diferencias en ambos parámetros se debe a que la ansiedad ejerce un

efecto modulador sobre los mismos. De esta forma, los linfocitos procedentes de los animales más ansiosos tanto aislados como agrupados manifestaron una menor quimiotaxis y una elevada proliferación basal en relación a sus compañeros menos ansiosos estabulados en similares condiciones. Por tanto, tener altos niveles de ansiedad afectaría de forma clara a ambas funciones linfocitarias, lo cual concuerda con lo obtenido en animales de experimentación y humanos con elevados niveles de ansiedad en cuanto a la disminución de la capacidad de movilidad hacia el foco de infección de los linfocitos (Puerto *et al.*, 2002; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2006a; Viveros *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009a; Vida y De la Fuente, 2013). Además, el hecho de que los ratones más ansiosos tanto aislados como agrupados presenten una elevada proliferación basal, en ausencia de estímulo alguno, podría apuntar a que estos individuos presentan lo que se ha denominado “inflamación estéril” en estado de reposo, que podría ser consecuencia de los efectos de una inflamación crónica de bajo grado sobre la funcionalidad de los leucocitos peritoneales.

Por su parte, la **actividad citotóxica NK** es menor en los individuos aislados con respecto a los agrupados, si bien esta diferencia no alcanza la significación estadística. Este hallazgo puede ser debido a la acción moduladora de la ansiedad sobre este estrés psicológico, de manera que responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento social induce un claro deterioro de esta importante función de defensa frente a las infecciones de tipo vírico y los procesos tumorigénicos. Así son los leucocitos peritoneales de los ratones aislados más ansiosos los únicos que muestran una menor actividad NK en relación a los animales agrupados con altos niveles de ansiedad e incluso con respecto a sus congéneres aislados menos ansiosos. Por tanto, si bien se ha descrito que el aislamiento social y la soledad inducen un deterioro de esta función inmunitaria tanto en roedores como en humanos (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; 1984b; Wu *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2009b) así como también los elevados niveles de ansiedad (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009a; Vida y De la Fuente, 2013), en el presente estudio se comprobó que es necesaria la conjunción de ambos factores (esto es, responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento) para que se produzca un claro descenso de la actividad citotóxica NK.



Así mismo, se sabe que los roedores que sufren aislamiento social o las personas que se sienten solas son más vulnerables a padecer enfermedades inflamatorias (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; Glaser *et al.*, 1985; House *et al.*, 1988; Cacioppo and Hawkley, 2003; Hawkley *et al.*, 2006; Kroenke *et al.*, 2006; Karelina *et al.*, 2011; Jaremka *et al.*, 2013). De hecho, en estos individuos así como en los que muestran elevados niveles de ansiedad se podría establecer una inflamación crónica de bajo grado o “inflamación estéril”, hallándose un aumento de marcadores inflamatorios sin existir una infección latente (Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Hackett *et al.*, 2012; Jaremka *et al.*, 2013; Volgelzangs *et al.*, 2013; Vida *et al.*, 2014). Así mismo, toda una serie de estudios han demostrado que el aislamiento social (Colaïanna *et al.*, 2013) así como la ansiedad (Bouayed *et al.*, 2009; Hovatta *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2014) incrementarían el estrés oxidativo de los individuos que lo padecen. Por lo tanto, los individuos aislados socialmente o con altos niveles de ansiedad manifestarían un mayor estrés oxidativo e inflamatorio crónico, que subyacería al deterioro inmunitario observado en los mismos. Y, además, la unión de ambos factores, aislamiento y ansiedad, agravaría aún más este estado pro-oxidante y pro-inflamatorio. Estos conceptos se verían apoyados por los resultados obtenidos en el presente trabajo, de manera que los ratones aislados y los agrupados más ansiosos manifiestan un deterioro de algunas de las funciones inmunitarias analizadas mientras que son los ratones más ansiosos sometidos a aislamiento social los que presentan una inmunosupresión más generalizada y severa. De forma similar, con el envejecimiento se establece un aumento de la inflamación y de la oxidación que se mantiene en el tiempo (Franceschi *et al.*, 2000a; De la Fuente y Miquel, 2009), causando el declive del organismo en general y de los sistemas reguladores en particular, incluyéndose el sistema inmunitario. Los ratones del presente estudio son viejos, por lo que padecer aislamiento y ansiedad y, sobre todo, responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento social en la vejez podría agravar el estado de inflamación y oxidación ya establecido por encontrarse en sus últimas etapas de vida, incrementando su vulnerabilidad a padecer patologías e incluso pudiendo ver acortada su esperanza de vida. De hecho, las funciones inmunitarias estudiadas en el presente subobjetivo se consideran marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez de Toda *et al.*, 2016), por lo que el deterioro de las mismas mostrado por los individuos con altos niveles de ansiedad, aislados y, especialmente los aislados más ansiosos, indica que éstos envejecen a mayor velocidad, esto es, presentarían una mayor edad biológica que

sus congéneres estabulados en grupo y menos ansiosos. Además, podrían vivir menos. Teniendo esto en cuenta y con el fin de conocer los efectos del aislamiento y de la ansiedad sobre la esperanza de vida de los individuos, éstos se mantuvieron estabulados en grupo o aislados (es decir, en las mismas condiciones) hasta su fallecimiento por causas naturales. Tras ser debidamente analizados, los resultados de la **longevidad media** indicaron que el aislamiento social durante la vejez reduce la esperanza de vida media de los ratones. Dichos resultados concordarían con la idea propuesta por otros autores de que el aislamiento social o la soledad están relacionados con una menor esperanza de vida en los individuos que los padecen (House *et al.*, 1988; Holt-Lunstad *et al.*, 2010; Pantell *et al.*, 2013). Además, los animales aislados más ansiosos mostraron la menor esperanza de vida de todos los grupos experimentales del estudio (aunque no alcanzó la significación estadística con respecto a los ratones aislados menos ansiosos). Este hallazgo apuntaría que responder inadecuadamente al aislamiento social (en este caso, responder con ansiedad) no sólo induciría una inmunosupresión más generalizada y severa en estos animales sino que también acortaría su esperanza de vida de forma más notable. Así mismo, la ansiedad también sería un factor que reduce la longevidad de los ratones, de formas que los individuos agrupados más ansiosos vivieron menos en relación con los agrupados menos ansiosos. Resultados que coinciden por los obtenidos en nuestro laboratorio previamente, según los cuales ratones con elevados niveles de ansiedad viven significativamente menos tiempo que sus congéneres menos ansiosos (Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Viveros *et al.*, 2007).

Por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente subobjetivo demuestran de nuevo que el aislamiento social y los altos niveles de ansiedad provocan el deterioro de algunas funciones inmunitarias, acelerando la senescencia y acortando la vida de los individuos que los padecen. No obstante, responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento supondría una aceleración de la velocidad de envejecimiento tal que aumentaría aún más el riesgo de morbilidad y mortalidad en estos individuos. De acuerdo con esta idea, los ratones aislados más ansiosos manifestaron una inmunosupresión más generalizada y severa en relación con el resto de grupos experimentales así como un acortamiento notable de su longevidad.

### 5.3.4. Efectos del aislamiento y la ansiedad sobre parámetros de conducta así como de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones adultos. Efectos sobre la longevidad media.

Los resultados obtenidos hasta el momento en el presente objetivo indican que la exposición a situaciones de estrés psicológico, como la separación materna en las primeras etapas de la vida o el aislamiento social así como responder con altos niveles de ansiedad al mismo en la vejez, acelerarían el proceso de inmunosenescencia en los individuos que lo padecen llegando incluso a acortar su esperanza de vida media, en el caso del aislamiento social. No obstante, a pesar de que en la edad adulta también se puede sufrir soledad, y sus consecuentes efectos deletéreos sobre la comunicación psiconeuroinmunoendocrina y la salud, muy pocos estudios se han centrado en analizar dichos efectos en individuos adultos. Por ello, en el presente subobjetivo nos propusimos estudiar si el aislamiento social, un potente estrés psicológico, podría inducir un efecto negativo no sólo sobre el sistema inmunitario, como el observado en los anteriores subobjetivos en los roedores viejos, sino también sobre el sistema nervioso, manifestado en alteraciones conductuales, en ratones adultos. Así mismo, también se analizó el posible efecto modulador de la ansiedad sobre la respuesta individual a dicho estrés y el efecto de la ansiedad *per se* en el funcionamiento de ambos sistemas reguladores en la edad adulta. Además, dado que el aislamiento y la ansiedad no sólo conllevan un aumento de la morbilidad sino también de la mortalidad, también se estudiaron las consecuencias de ambos factores sobre la longevidad de los individuos.

Con respecto a la **evolución de los niveles de ansiedad** en los ratones adultos del presente estudio, antes y después de someterse al protocolo de 4 semanas de aislamiento social, éstos fueron analizados mediante los datos obtenidos en el “laberinto en cruz elevado”. Los resultados muestran, en general, que el aislamiento social induce un aumento de los niveles de ansiedad en los ratones adultos dado que éstos permanecen durante menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto. De hecho, una de los cambios conductuales más claros asociados con el aislamiento social es que este tipo de estrés psicológico supone un aumento de los niveles de ansiedad en los individuos que lo padecen, independientemente de su especie, sexo o edad (Arranz *et al.*, 2009b; Arndt *et al.*, 2009; Yorgason *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015; Lander *et al.*, 2017). Además, los resultados obtenidos en el presente subobjetivo nos permiten conocer

cómo evolucionó la respuesta de ansiedad frente al aislamiento social en función de si los animales eran previamente a este protocolo más o menos ansiosos. Así, dentro de los individuos aislados, aquellos que mostraron una mayor conducta ansiosa antes de someterse al aislamiento ven más incrementada su ansiedad tras dicho protocolo en comparación con sus congéneres aislados menos ansiosos. Por tanto, mostrar de por sí unos elevados niveles de ansiedad conllevaría un deterioro aún mayor de la respuesta ante un estrés psicológico.

Con el fin de profundizar en los cambios conductuales que podría inducir el aislamiento social, la respuesta de ansiedad al mismo y el grado de ansiedad previo, en los ratones adultos, se llevó a cabo un **estudio conductual** tras las 4 semanas de aislamiento social evaluando toda una serie de parámetros como fueron las capacidades sensoriomotoras, las actividades exploratorias espontánea y dirigida así como la conducta de ansiedad en todos los individuos del estudio. Con respecto a las **capacidades sensoriomotoras**, los resultados indican que el aislamiento social produjo en los animales un deterioro de dichas capacidades, mostrando los animales aislados un menor vigor muscular, una menor coordinación motora y una menor tracción. Si bien no existe bibliografía directa acerca de cómo el aislamiento social afecta a las capacidades sensoriomotoras en la edad adulta, otros autores han observado que roedores sometidos a aislamiento social en edades tempranas (infancia y adolescencia) mostrarían déficits en su locomoción (Martin y Brown, 2010; Möller *et al.*, 2011), que podría indicar un deterioro de las habilidades sensoriomotoras aquí evaluadas, como la coordinación motora o el vigor muscular. No obstante, los resultados muestran que son los individuos aislados con mayor ansiedad los que manifiestan el mayor declive en estas funciones en relación a los aislados menos ansiosos, por lo que la conjunción de ambos factores mermaría de forma más marcada las capacidades sensoriomotoras aquí evaluadas. De hecho, la ansiedad *per se* también influiría en dichas capacidades. Así, los ratones agrupados con mayores niveles de ansiedad presentan un deterioro del vigor muscular, de la coordinación motora y de la tracción en relación a sus compañeros estabulados en similares condiciones menos ansiosos. En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado un declive de estas capacidades sensoriomotoras en los PAM, y recordemos que estos ratones prematuramente envejecidos se caracterizan por mostrar unos mayores niveles de ansiedad (entre otras alteraciones conductuales) (Guayervas *et al.*, 2000; Guayervas *et al.*, 2002b; Pérez-Álvarez *et al.*,

2005; Vida y de la Fuente, 2013). Además, en los presentes resultados, se observó en los individuos sometidos a aislamiento una menor conducta de asunción de riesgos, lo cual corrobora lo obtenido previamente en otros estudios, en los que se postula que esa menor capacidad es debida a los altos niveles de ansiedad mostrados por ratones hembra aisladas con respecto a las que conviven en grupo (Palanza *et al.*, 2001; Arndt *et al.*, 2009).

En relación a las **conductas de exploración**, se aprecia que los animales aislados manifestaron una mayor **exploración horizontal y vertical espontáneas** con respecto a los agrupados. Estos resultados concuerdan con los observados en otros estudios en los que han relacionado al aislamiento social con un aumento de la locomoción en los roedores sometidos al mismo (Lander *et al.*, 2017). No obstante, existen controversias al respecto, que podrían depender de la duración del estrés. Así, Weiss *et al.* (2004) observaron que ratas aisladas de forma crónica desde el destete no modificaron su locomoción con respecto a las no aisladas. Por su parte, al igual que en las capacidades sensoriomotoras, la ansiedad también ejercería un efecto sobre la actividad exploratoria. Así, los ratones aislados más ansiosos mostraron menores actividades de exploración tanto horizontal como vertical con respecto a los aislados menos ansiosos, por lo que de nuevo la interrelación de ambos factores lleva a un deterioro más acusado de dichos parámetros. Además, se ha postulado que la ansiedad supone una reducción de la actividad exploratoria en los roedores, hecho corroborado al observar que tras la administración de ansiolíticos aumenta no sólo éste parámetro sino que también disminuyen las conductas de congelación (más conocido por su término en inglés, *freezing*) y de tigmotaxia (Karl *et al.*, 2008). Así mismo, los PAM, que como ya se ha indicado tienen altos niveles de ansiedad, se caracterizan por una menor capacidad de exploración espontánea (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Vida y De la Fuente, 2013). De acuerdo con todo ello, los ratones agrupados con altos niveles de ansiedad del presente estudio exhibieron una menor actividad exploratoria espontánea tanto horizontal como vertical con respecto a los agrupados menos ansiosos. En relación a la actividad de exploración dirigida, medida en el “tablero de agujeros” (mediante la exploración activa de los agujeros existentes en el mismo), cabe destacar que sólo los ratones aislados con altos niveles de ansiedad muestran unos menores valores en este parámetro entre todos los grupos experimentales de estudio, no existiendo diferencias en el mismo debidas al aislamiento social. Este hecho puede ser debido a

una acción conjunta del aislamiento social y la ansiedad, de manera que al ser más ansiosos explorarían menos los agujeros y al vivir aislados manifiesten anhedonia o pérdida de interés o motivación. En este sentido, se ha demostrado que el número de exploraciones de agujeros se encuentra inversamente relacionado con los niveles de ansiedad del individuos (Bilkei-Gorzó y Gyertyán, 1996) y que el aislamiento social supone un aumento de conductas depresivas, incluyéndose la anhedonia (que implica una pérdida de interés o desmotivación) en especies sociales (Grippe *et al.*, 2007).

Las **conductas de ansiedad** también se ven alteradas en el aislamiento social. Así, los ratones aislados manifestaron un incremento de dicha conducta tanto en cuanto permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del “laberinto en cruz elevado” y exhibieron una mayor conducta de acicalamiento en relación a los agrupados. Así mismo, el aislamiento también incrementó la tigmotaxia en los ratones con respecto a los que convivían en grupo, esto es, mostraron una menor deambulación interna con respecto a la total realizada en el “tablero de agujeros”. Estos hallazgos no hacen más que corroborar el hecho de que, como se ha comentado previamente, el aislamiento social induce un aumento de los niveles de ansiedad en los individuos que lo padecen (Arranz *et al.*, 2009b; Arndt *et al.*, 2009; Yorgason *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015; Lander *et al.*, 2017). Por su parte, y lógicamente, los ratones previamente clasificados como más ansiosos, tanto aislados como agrupados, también manifiestan un incremento de sus respuestas de ansiedad, destacándose un menor tiempo de permanencia en los brazos abiertos del “laberinto en cruz elevado”, una mayor conducta de acicalamiento y una mayor tigmotaxia, con respecto a sus congéneres menos ansiosos. Si bien, dicho incremento de las conductas de ansiedad es más notable, en algunos de los parámetros evaluados, en los animales sometidos a aislamiento social más ansiosos que en los agrupados con menores niveles de ansiedad.

Por lo tanto, los resultados obtenidos del estudio conductual demuestran que el aislamiento social en los ratones adultos conlleva un aumento de las respuestas de ansiedad, un déficit de la conducta de exploración tanto espontánea como dirigida así como un deterioro de las capacidades sensoriomotoras de los animales. No obstante, mostrar mayor ansiedad antes de someterse a dicho estrés psicológico, acentuaría el declive comportamental observado. Dado que la mayoría de los cambios observados en los parámetros conductuales analizados

en el presente subobjetivo también se hallan en individuos cronológicamente viejos (Shukitt-Hale *et al.*, 1999; Belzung y Griebel, 2001; File y Seth, 2003; Butterfield *et al.*, 2004; Francia *et al.*, 2006; Serrajd y Jamon, 2007) así como en animales con un envejecimiento prematuro, incluyéndose a los PAM (Vida y De la Fuente, 2013), las hembras ovariectomizadas (Baeza *et al.*, 2010) o sujetos obesos (De Castro, 2016), el aislamiento social y, especialmente enfrentarse y responder a él con altos niveles de ansiedad, podría acelerar el proceso de senescencia del sistema nervioso en la edad adulta, aumentando la edad biológica de los individuos. Así mismo, los resultados de este subobjetivo corroboran que ser más ansioso también aceleraría el declive conductual, lo cual concuerda con lo observado en los PAM adultos, que se caracterizan por tener unos elevados niveles de ansiedad.

Atendiendo a las **valoraciones inmunológicas**, el aislamiento social indujo un deterioro de la **respuesta proliferativa** de los linfocitos peritoneales a los mitógenos, que mimetizan en el cultivo *in vitro* la respuesta desencadenada *in vivo* por los antígenos. Así, los linfocitos (tanto B como T) de los ratones aislados exhibieron una menor proliferación en presencia de LPS y ConA con respecto a los de los estabulados en grupo. Esta disminuida capacidad para proliferar en respuesta a los estímulos antigénicos de ambas subpoblaciones de linfocitos debida al aislamiento social se corrobora no sólo con estudios previos de otros autores (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984b; Lu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000), sino también con los obtenidos en las ratas macho viejas aisladas y en los ratones hembras viejas aisladas de los subobjetivos 3.2. y 3.3., respectivamente, de la presente Tesis. Teniendo en cuenta los niveles de ansiedad mostrados por los individuos antes de someterse al protocolo de aislamiento social, los linfocitos de los ratones aislados más ansiosos son los que exhiben el mayor deterioro en su respuesta proliferativa a los mitógenos empleados en relación al resto de grupos experimentales. Por lo que la conjunción de ambos factores mermaría aún más esta función linfocitaria, especialmente en los linfocitos T, pues es frente a Con A donde se dan los valores menores. De hecho, manifestar altos niveles de ansiedad ya afectaría en cierto grado a la proliferación de los linfocitos, de manera que los ratones agrupados más ansiosos muestran un aumento de la proliferación basal o en estado de reposo (indicativa de la existencia de una inflamación crónica de bajo grado, en ausencia de patógenos) así como una menor respuesta proliferativa a LPS, en comparación con los animales agrupados menos ansiosos.

Estas alteraciones debidas a la ansiedad ya se han observado previamente en los PAM, que se caracterizan por ser más ansiosos que sus congéneres adultos (Guayerbas *et al.*, 2002a; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013). El aislamiento social en la edad adulta, por otro lado, no parece afectar a la **actividad citotóxica NK** de forma que tanto los leucocitos peritoneales de los animales aislados como de los agrupados muestran similares valores en esta función inmunitaria. Esta ausencia de diferencias en dicho parámetro entre ambos grupos se debe a los efectos de la ansiedad sobre el mismo. Así, los animales que viven en grupo y son más ansiosos muestran una actividad NK significativamente menor que la de sus compañeros estabulados en similares condiciones con menores niveles de ansiedad y similar a la exhibida por los animales aislados más ansiosos. Este hecho hace que el valor de este parámetro se vea reducido al tomar en conjunto los datos de todos los individuos agrupados, independientemente de sus niveles de ansiedad, haciendo que sea similar al obtenido en los animales aislados. Sin embargo, el aislamiento social sí que deterioraría la actividad citotóxica NK al considerar el nivel de ansiedad, dado que la actividad NK de los individuos aislados menos ansiosos presentan menores niveles de esta función inmunitaria con respecto a los agrupados con bajos niveles de ansiedad. El hecho de que el aislamiento social deteriora la actividad NK de los leucocitos ya ha sido observado por otros autores (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984a; 1984b; Wu *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2009b) y en la presente Tesis en las ratas macho viejas del subobjetivo 3.2. y en los ratones hembra viejas del objetivo 3.3. Sin embargo, la ansiedad parece tener un papel más determinante en el declive de esta importante función inmunitaria en la edad adulta, de manera que no sólo los individuos aislados más ansiosos sino también los agrupados con altos niveles de ansiedad muestran un deterioro similar en este parámetro. Estos resultados se ven apoyados por otros estudios en los que se ha comprobado que tener altos niveles de ansiedad, induce un deterioro de la actividad citotóxica NK, de gran importancia para la defensa ante infecciones víricas y procesos tumoregénicos, tanto en humanos como en roedores (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009a; Vida y De la Fuente, 2013).

Por otro lado, muchos autores han postulado que el deterioro que induce sobre la salud el estrés psicológico crónico, como el aislamiento social, podría deberse al establecimiento de una



inflamación crónica de bajo grado (Miller *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2007). Así mismo, también se ha observado que el aislamiento produce un descenso de algunas enzimas antioxidantes (como la catalasa, la GPx y la súperóxido dismutasa) acompañado de un aumento de los niveles de ROS en algunas regiones cerebrales (Shao *et al.*, 2015). De igual manera, los altos niveles de ansiedad se han relacionado con un aumento de la inflamación y la oxidación, que afectaría fundamentalmente a los sistemas reguladores y a la comunicación psiconeuroinmunoendocrina (Vida *et al.*, 2014). Por ello, nos propusimos valorar toda una serie de parámetros de oxidación en los leucocitos peritoneales de los ratones de este subobjetivo para conocer si una alteración del estado redox de estas células pudiera subyacer al deterioro funcional observado en los individuos aislados además de en los más ansiosos, sometidos o no a aislamiento, del presente estudio. Los resultados obtenidos en el **estado redox** muestran que el aislamiento indujo un descenso de las actividades enzimáticas antioxidantes catalasa y GR, lo que concuerda con resultados obtenidos en estudios previos (Shao *et al.*, 2015). Además, en el caso de la catalasa, los individuos aislados más ansiosos mostraron los menores valores de esta importante enzima antioxidante. No obstante, a pesar de que se ha postulado que la ansiedad induciría un estrés oxidativo, como se ha comentado anteriormente, los ratones agrupados con altos niveles de ansiedad manifestaron similares valores a los observados en los individuos agrupados menos ansiosos en los parámetros redox analizados. Por tanto, en los ratones adultos padecer de aislamiento y, particularmente, enfrentarse y responder a él con altos niveles de ansiedad induciría un descenso de las defensas antioxidantes en los leucocitos peritoneales, si bien éste no es generalizado.

Por lo tanto, los resultados obtenidos respecto al estudio de la funcionalidad y del estado redox de los leucocitos peritoneales apuntan que el aislamiento social en la edad adulta induce un deterioro de alguna de las funciones inmunitarias, concretamente de la capacidad de proliferación de los linfocitos en respuesta a mitógenos. Y este declive funcional podría ser debido al descenso de algunas defensas antioxidantes, como la catalasa y la GR, en estas células. No obstante, enfrentarse y responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento agravaría esta inmunosupresión, viéndose afectada también la actividad citotóxica NK en los ratones adultos aislados más ansiosos, los cuales también muestran un acusado descenso de la actividad de la enzima antioxidante catalasa, en comparación con los agrupados con menores niveles de ansiedad. También, cabe mencionar

que la ansiedad *per se* afectaría algunas de las funciones inmunitarias analizadas.

Algunos de los parámetros inmunitarios analizados en el presente estudio también se hallan deteriorados en individuos cronológicamente viejos (Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Di Lorenzo *et al.*, 1999; Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Mocchegiani y Malavolta, 2004; Puerto *et al.*, 2005; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2008; 2010a; De la Fuente *et al.*, 2008a; Mate, 2015) así como en modelos de envejecimiento prematuro, como los PAM (Vida y De la Fuente, 2013), la ovariectomía (Baeza *et al.*, 2010) o la obesidad (De Castro, 2016) y son considerados marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martinez De Toda *et al.*, 2016). De forma similar, y como se ha comentado anteriormente, también las alteraciones conductuales observadas en el presente estudio se asemejan a las observadas en el envejecimiento fisiológico y prematuro. Por tanto, y dadas estas similitudes, nos planteamos si el declive del sistema nervioso e inmunitario mostrado por los individuos adultos aislados, especialmente los más ansiosos, así como por los animales agrupados con altos niveles de ansiedad podrían indicar que éstos están experimentando una aceleración de su proceso de envejecimiento, que podría acortar su esperanza de vida. Por ello, los animales del estudio se mantuvieron estabulados en similares condiciones a lo largo de su vida y, tras su fallecimiento por causas naturales, se analizó su longevidad. A pesar del deterioro conductual e inmunitario observado en los ratones aislados, los resultados de la **longevidad media** muestran que, si bien, éstos vivieron menos que los animales agrupados, dicha diferencia no alcanzó la significación estadística. Así mismo, tener altos niveles de ansiedad (estando o no sometido a aislamiento social) no modificó la esperanza de vida de los individuos. Por tanto, dados estos resultados en la longevidad media, ni el aislamiento social ni enfrentarse a él con altos niveles de ansiedad o tener altos niveles de ansiedad (aun viviendo en grupo) en la edad adulta podrían postularse como modelos de envejecimiento prematuro.

En resumen, el aislamiento social, particularmente en los ratones más ansiosos, produjo un deterioro conductual e inmunitario así como un descenso de algunas defensas antioxidantes en los leucocitos en la edad adulta, similar al observado en el envejecimiento fisiológico y prematuro, sin modificar la esperanza de vida de los individuos. Así mismo, los altos niveles de ansiedad (sin enfrentarse a dicho estrés

psicológico crónico) también indujeron un declive conductual e inmunitario semejante al observado en animales viejos y prematuramente envejecidos sin ver acortada su esperanza de vida. Estos resultados contradirían a lo observado por otros autores además de a los resultados obtenidos en el subobjetivo 3.3. de la presente Tesis, en los que se ha propuesto que el aislamiento social y la ansiedad aumentan el riesgo de mortalidad de los individuos que los padecen (House *et al.*, 1988; Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Viveros *et al.*, 2007; Holt-Lunstad *et al.*, 2010; Pantell *et al.*, 2013). No obstante, un deterioro de la funcionalidad de los sistemas reguladores, como el nervioso y el inmunitario que implica una pérdida de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina y de la homeocinesis y, por tanto, una pérdida del estado de salud, podría no acelerar el proceso de senescencia y, por tanto, no afectar la longevidad de los individuos. De hecho, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, y que se encuentran en vías de publicación, han demostrado que individuos adultos así como NPAM adultos estabulados en un ambiente social negativo (con ratones viejos o PAM, respectivamente) manifiestan una alteración conductual e inmunitaria similar a la asociada con el avance de la edad, no viéndose afectada su esperanza de vida (Garrido, 2017). En este estudio, quizás los ratones adultos aislados y/o más ansiosos han podido desarrollar mecanismos de adaptación u horméticos que han permitido la recuperación del funcionamiento de sus sistemas reguladores, alcanzando unas longevidades similares a las de sus congéneres agrupados y/o menos ansiosos. Lamentablemente, carecemos de datos que nos permitan apoyar esta hipótesis. Así, un análisis de esos animales cuando hubiesen alcanzado una mayor edad cronológica podría haber aclarado esa propuesta. Por ello, sería necesario realizar futuras investigaciones para profundizar en los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en la edad adulta sobre la capacidad funcional de los sistemas reguladores así como sobre la longevidad.

#### **5.4. ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL PARA MEJORAR PARÁMETROS CONDUCTUALES Y DE FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, PREMATURO Y ACELERADO. EFECTOS SOBRE LA LONGEVIDAD.**

El envejecimiento es un proceso fisiológico inevitable pero también modulable. Por ello es posible diseñar intervenciones o estrategias con el fin de ralentizar sus efectos deletéreos sobre el

organismo así como disminuir las probabilidades de padecer enfermedades asociadas con la edad. Entre estas intervenciones, una estrategia que viene adquiriendo interés en los últimos años es el “enriquecimiento ambiental” (EA), que se podría definir como una aproximación experimental en animales de experimentación al mantenimiento de una vida intelectual, física y social activa en humanos. Numerosos estudios han demostrado los beneficios del EA, mediante la introducción de objetos en las jaulas de estabulación, sobre los sistemas nervioso y endocrino, pero muy pocos abordan los efectos que puede ejercer sobre el sistema inmunitario, y muchos menos sobre la esperanza de vida del individuo. Por otra parte, con la finalidad de buscar otras nuevas estrategias de enriquecimiento ambiental diferentes a la introducción de objetos en el ambiente de estabulación de los animales, y teniendo en cuenta los conocidos efectos beneficiosos sobre la salud desde tiempos muy antiguos de la terapia de baños o balneoterapia, especialmente en la vejez, nos propusimos en el presente objetivo proponer a la hidroterapia (tanto con agua corriente como mineralo-medicinal) como una nueva estrategia de enriquecimiento ambiental.

### **5.4.1. Efectos del enriquecimiento ambiental con juguetes y de la hidroterapia sobre la conducta, así como en la función y el estrés oxidativo de leucocitos, en ratones cronológicamente viejos. Efectos sobre la longevidad.**

La capacidad del EA “clásico” (introduciendo objetos de diferentes formas y texturas, que pueden cambiarse de forma periódica, en la zona de estabulación de los animales) para conservar adecuadamente las capacidades mentales y conductuales, así como fisiológicas, de los individuos es ampliamente reconocida. En general, los efectos positivos de este tipo de EA sobre el organismo son consecuencia de las modificaciones moleculares, celulares y funcionales que ejerce esta intervención y que, finalmente, se traducen en un mejor estado de salud de los sujetos sometidos a ella. Como se ha indicado, toda una serie de estudios han demostrado los beneficios del EA con objetos o juguetes en el envejecimiento, siendo una estrategia eficaz para revertir el deterioro neurológico y cognitivo que se produce con la edad (Mattson *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Mora, 2013). También nuestro grupo ha realizado experimentos comprobando el efecto positivo de esta estrategia en la

inmunosenescencia (Arranz *et al.*, 2010c). Estos efectos del EA con juguetes en la vejez, particularmente sobre los sistemas reguladores, asegurarían el mantenimiento de la homeostasis permitiendo alcanzar una longevidad saludable.

Por su parte, la hidroterapia o el tratamiento con baños, que consiste en bañar a los individuos en agua caliente, se podría ajustar a la definición del EA que se ha indicado, por lo que nuestro grupo de investigación la ha propuesto como una nueva estrategia de EA (De la Fuente *et al.*, 2011). A pesar de que la hidroterapia es uno de los métodos más antiguos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, sus efectos sobre el organismo han sido muy poco estudiados, limitándose a trabajos en los que esta intervención se emplea para paliar el dolor y la severidad de los síntomas de enfermedades inflamatorias que afectan al tejido óseo y muscular y a las articulaciones, como la osteoartritis o la lumbalgia (Karagülle y Karagülle, 2015; Forestier *et al.*, 2016), o en medicina rehabilitadora (Beer y Jobst, 2016). Teniendo en cuenta todo lo anterior, en el presente subobjetivo nos planteamos si un EA con juguetes de corta duración (4-6 semanas) podría revertir el deterioro de toda una serie de parámetros conductuales así como de función y de estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales de ratones hembra viejos. Así mismo, se compararon dichos efectos con los ejercidos por una intervención de hidroterapia (usando agua corriente) del mismo tiempo de duración, para comprobar su posible valía como una nueva estrategia de EA. Por otro lado, dada la relación existente entre preservar una adecuada comunicación psiconeuroinmunoendocrina y la esperanza de vida, se analizaron los efectos de ambas intervenciones sobre la longevidad media de los ratones viejos sometidas a ellas.

Con respecto al **estudio conductual** realizado en el presente subobjetivo, en éste se determinaron toda una serie de parámetros comportamentales tales como las capacidades sensoriomotoras, las actividades exploratorias espontánea y dirigida y diversas conductas de ansiedad. En relación a las **capacidades sensoriomotoras**, cabe destacar que tanto el EA con juguetes como con hidroterapia en los ratones viejos indujo un aumento de la **coordinación motora** en la “tabla de madera” en relación a los controles, siendo incluso superior a la mostrada por los controles de edad adulta. Éste hecho podría deberse a que el EA parece mejorar la respuesta de los individuos a los ambientes nuevos y estresantes, debido a una reducción de su emotividad, lo cual se ha observado previamente en otros estudios en

roedores estabulados en un ambiente enriquecido con juguetes (Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014). Así mismo, los resultados en estas pruebas conductuales apuntan a que ambas estrategias de EA aumentan la **evaluación y la asunción del riesgo** en los animales viejos, especialmente en los individuos sometidos a hidroterapia y en la “cuerda tirante”. Este hallazgo corroboraría la idea de que el EA favorece la adaptación rápida a nuevos ambientes así como reduce el miedo ante eventos aversivos o estresantes, lo cual se ha observado en ratas adultas (Barbelivien *et al.*, 2006). Esto explicaría por qué los ratones viejos estabulados en un ambiente enriquecido con juguetes o sometidos a la terapia de baños no sólo evalúan sino que también deciden asumir el riesgo y determinan tirarse del aparato, sin continuar realizando la prueba. Teniendo en cuenta estas respuestas mostradas por los animales viejos enriquecidos, se entiende que no se haya detectado mejora alguna en otras de sus capacidades sensoriomotoras como el **equilibrio, el vigor muscular o la tracción**, e incluso en algunos parámetros de determinación de la coordinación motora en las pruebas conductuales realizadas. Mostrando los animales expuestos a EA en estos parámetros, o bien ningún cambio o incluso menores valores en los mismos con respecto a los controles viejos y alejándose de los valores mostrados por los controles adultos, en algunos casos.

Por su parte, numerosos estudios han demostrado que el EA con juguetes incrementa la **conducta locomotora y exploratoria** en roedores sometidos al mismo (Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Harati *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014), aunque existen datos controvertidos (Pietropaolo *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo en cuanto a la **exploración espontánea horizontal**, indican que el protocolo de EA con juguetes de 4 semanas de duración o bien no modificó esta conducta (en el “campo abierto”) o incluso la aminoró (en el “tablero de agujeros”) con respecto a los animales viejos no enriquecidos. Así mismo, los ratones viejos sometidos a hidroterapia mostraron la misma deambulación con respecto a los controles viejos en el “tablero de agujeros”. Algunos autores, con semejantes resultados a los aquí observados, han postulado que la exposición a un ambiente enriquecido podría inducir cierta habituación a la situación de novedad que supone la prueba conductual, de manera que conforme progresa la prueba reducirían su actividad exploratoria espontánea o locomotora con respecto a la de los animales no enriquecidos (Larsson *et al.*, 2002;

Schrijver *et al.*, 2002). Este proceso de habituación podría explicar por qué en el presente estudio no observamos diferencias o incluso se han determinado menores niveles de exploración horizontal espontánea en los animales sometidos a EA con juguetes o a hidroterapia. También en los controles de edad adulta se observa un hecho similar en comparación con los controles viejos. En este punto, cabe destacar que en el “campo abierto” los ratones viejos expuestos a hidroterapia presentaron la mayor deambulaci3n, y por tanto la mayor actividad exploratoria horizontal espontánea, de todos los grupos de estudio. En este caso puede que el efecto mecánico beneficioso del baño produzca una mejora en la movilidad de estos animales, al igual que han propuesto otros autores (Bacaicoa San Martin, 2006). Por su parte, los efectos beneficiosos de ambas estrategias de EA sobre la **exploraci3n vertical** en los animales viejos parecen más claros. Así, tanto los animales sometidos a EA con juguetes como a hidroterapia manifestaron, en general, una mayor actividad exploratoria vertical espontánea con respecto a los controles viejos, siendo similar a la manifestada por los controles de edad adulta. Estos datos son coincidentes con los obtenidos previamente, en el que el EA indujo un aumento de las exploraciones verticales en los animales enriquecidos con respecto a los no enriquecidos (Larsson *et al.*, 2002). De igual forma, los resultados obtenidos respecto a la **actividad exploratoria dirigida**, evaluada en el “tablero de agujeros”, apuntan que tanto el EA con juguetes como la hidroterapia provocaron un aumento de dicha exploraci3n con respecto a la mostrada por los ratones viejos no sometidos a EA, observándose en estos animales enriquecidos unos valores similares a los mostrados por los controles adultos. A este respecto, dichos resultados concuerdan que la idea generalizada de que el EA con juguetes incrementa la conducta exploratoria en roedores, incluyéndose la evaluada en la misma prueba conductual del “tablero de agujeros” (Escorihuela *et al.*, 1994; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Harati *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014).

Por otro lado, el efecto ansiolítico del EA est3 ampliamente aceptado, de manera que numerosos estudios demuestran que los roedores expuestos a un ambiente enriquecido ven disminuidas de forma significativa sus conductas de ansiedad (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Pena *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2006; Leal-Galicia *et al.*, 2008; Arranz, 2009; Harati *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2015), incluso tras una exposici3n al mismo de corta duraci3n (3 semanas) (Leger *et al.*, 2015). De forma similar, se ha postulado que la terapia de baños con aguas

atemperadas también podría inducir cierto efecto relajante, y por tanto, atenuador de la ansiedad (Bacaicoa San Martin, 2006). Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo acerca de las **respuestas de ansiedad** apoyan los hallazgos anteriores, dado que tanto los ratones viejos estabulados con juguetes como los sometidos a hidroterapia manifestaron no sólo una menor conducta de ansiedad sino también una mejor respuesta ante las situaciones novedosas y estresantes que suponen las distintas pruebas de conducta evaluadas. Así, ambos grupos de animales enriquecidos mostraron, en general, menores conductas de neofobia, de acicalamiento y de defecación con respecto a los controles viejos, asemejándose a los valores obtenidos a los adultos control en dichos parámetros. Además, los ratones expuestos a EA con juguetes e hidroterapia también tardaron menos tiempo en abandonar el punto de partida en el “campo abierto” así como deambularon más por la zona interna y mostraron una menor tigmotaxia en el “campo abierto” y en el “tablero de agujeros”. En este último aspecto, cabe destacar que el efecto atenuante del EA con juguetes sobre las respuestas de ansiedad parece más generalizado y acentuado que el ejercido por la hidroterapia.

Todos los cambios o modificaciones conductuales debidos al EA observados, no sólo en nuestros resultados, sino también por otros autores, pueden ser consecuencia de los efectos beneficiosos sobre el sistema nervioso que induce este tipo de intervención. Así, mantenerse estabulado en un ambiente enriquecido parece inducir importantes cambios en el funcionamiento de distintos sistemas de neurotransmisores en el cerebro, como el dopaminérgico (Bezdard *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004; 2005; Faherty *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005; Del Arco *et al.*, 2007a; 2007b) o el colinérgico (Rosenzweig y Bennet, 1996; van Praag *et al.*, 2000; Del Arco *et al.*, 2007a; 2007b). También, parece fomentar la plasticidad cerebral y los procesos de neurogénesis, particularmente en el hipocampo y en la corteza cerebral (Van Praag *et al.*, 2000; Kempermann *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2007; Schloesser *et al.*, 2010). En este sentido, el aumento de la producción y expresión de diversos factores neurotróficos, como el BDNF o el NFG (del inglés, *Nerve Growth Factor*), que se induce por la exposición al EA (Kazlauckas *et al.*, 2011), podría también subyacer a la mejora del funcionamiento del sistema nervioso en los animales estabulados en condiciones de enriquecimiento. Además, algunos estudios apuntan que a los beneficios demostrados del EA sobre la conducta contribuiría un aumento de la expresión de GC en el hipocampo, lo que proporcionaría mayor eficacia al mecanismo de



retroalimentación negativo sobre el eje HHA (Mohammed *et al.*, 1993; Olsson *et al.*, 1994; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014). Por tanto, toda esta serie de modificaciones neurológicas debidas al EA suponen, en última instancia, una mejor respuesta de los individuos sometidos a dicha intervención a los ambientes novedosos y estresantes que, junto con el efecto ansiolítico que parece inducir esta estrategia, les permitiría mostrar una mejora conductual, como se comprueba en los resultados de la presente tesis.

Con el avance de la edad se produce un deterioro de los procesos y sistemas neurológicos anteriormente mencionados. De esta manera, con el envejecimiento se han descrito alteraciones en los sistemas dopaminérgico (Luine *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994; Volkow *et al.*, 2000; Li y Rieckmann, 2014) y colinérgico (Decker, 1987; Fischer *et al.*, 1987; Biegon *et al.*, 1988; Luine y Hearn, 1990; Stemmelin *et al.*, 2004; Schliebs y Arendt, 2011), así como se ha demostrado la menor expresión de factores neurotróficos, como el BDNF (Gooney *et al.*, 2004; Adlard *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2007) y los procesos de neurogénesis (Lazarov *et al.*, 2010; Couillard-Després, 2013; Seib y Martín-Villalba, 2015). De igual forma, la actividad del eje HHA también se ve alterada al envejecer (Sapolsky *et al.*, 1987; Lupien *et al.*, 2001; Tizabi *et al.*, 2003; Aguilera, 2011). Como se ha indicado, algunos estudios han demostrado que el EA es capaz de actuar sobre estos procesos (Paban *et al.*, 2005; Segovia *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2007; 2013; Garrido, 2011; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014), atenuando e incluso revirtiendo el deterioro conductual y cognitivo debido al envejecimiento. Teniendo en cuenta esto, podemos postular que dichos efectos positivos del EA sobre los sistemas nervioso y endocrino en la vejez subyacerían a la mejora conductual observada en los ratones viejos expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes del presente subobjetivo, que alcanzan valores similares a los obtenidos en los ratones adultos. Dadas las similitudes en los parámetros de conducta observadas en este estudio entre los ratones sometidos a EA con juguetes y los que recibieron el tratamiento de baños, la hidroterapia se postula como una prometedora estrategia de EA válida para revertir el deterioro conductual asociado con la edad. Lamentablemente, no existen referencias bibliográficas que nos permitan decir que la hidroterapia también induce las mismas modificaciones neurológicas y conductuales que el EA “clásico”, mucho menos en la vejez, lo que debería ser tenido en cuenta para futuras investigaciones.

Si los efectos beneficiosos del EA sobre los sistemas nervioso y endocrino son evidentes, en la función del sistema inmunitario, también parecen serlo, aunque este es un aspecto poco estudiado. Además, dada la reciprocidad de la comunicación psiconeuroinmunoendocrina, un adecuado funcionamiento neuroendocrino se reflejaría en una buena inmunidad y viceversa. En cuanto a las **valoraciones inmunitarias** llevadas a cabo en el presente subobjetivo, los resultados muestran que ambas estrategias de EA mejoran algunas de las funciones inmunitarias evaluadas en los ratones viejos. Así, en relación a la **función de macrófagos**, tanto el EA con juguetes como la hidroterapia produjeron un aumento significativo de la **quimiotaxis** así como de la **capacidad fagocítica** en los ratones viejos, alcanzando valores similares a los obtenidos en los controles de edad adulta, lo que es coincidente con resultados previos obtenidos por nuestro equipo de investigación en un protocolo de EA con juguetes (Arranz *et al.*, 2010c). Tanto la movilidad hacia el foco de infección como la capacidad para ingerir partículas extrañas por parte de los fagocitos se encuentran disminuidas con la edad (Niwa *et al.*, 1989; Guayerbas *et al.*, 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda, 2016), por lo que el aumento en los niveles de ambos parámetros inducido por los dos tipos de EA demuestra su validez para controlar la inmunosenescencia.

Por su parte, las **funciones linfocitarias** también se deterioran con el envejecimiento. Así, en roedores, tanto la quimiotaxis de los linfocitos (Ortega *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez De Toda *et al.*, 2016) como la respuesta de proliferación de las células T y B a diversos estímulos (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2004a; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008a; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda *et al.*, 2016) disminuyen con la edad. Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo indican que tanto el EA con juguetes como la hidroterapia aumentan la capacidad de migración de los linfocitos peritoneales hacia el foco de infección o **quimiotaxis** en relación a los ratones viejos no enriquecidos, asemejándose (sin llegar a igualarse) a los valores obtenidos en los controles de edad adulta. Por tanto, ambas estrategias demuestran su valía para atenuar el deterioro de este parámetro asociado con la edad, de igual forma que lo observado en anteriores trabajos en los que ratones viejos expuestos a un ambiente enriquecido con juguetes mostraron un aumento de la capacidad quimiotáctica de sus linfocitos (Arranz *et al.*, 2010c). En cuanto a la **capacidad**

**proliferativa** de los linfocitos al mitógeno **ConA** (que de forma preferente estimula a los linfocitos T), los resultados muestran que ésta también aumenta en los animales viejos sometidos a EA con juguetes o a hidroterapia con respecto a la obtenida en los controles viejos no enriquecidos, siendo incluso mayor que la mostrada por los controles de edad adulta. Este hallazgo demuestra que ambos tipos de EA son capaces de revertir el declive funcional de los linfocitos T que sucede con el envejecimiento, lo cual también es coincidente con lo obtenido en estudios anteriores de EA con juguetes en ratones viejos (Arranz *et al.*, 2010c). Así mismo, los linfocitos peritoneales procedentes de los ratones viejos expuestos a un ambiente enriquecido y a la terapia de baños proliferaron más en presencia del mitógeno **LPS** en relación a los de los controles viejos no enriquecidos, siendo este aumento más notable en los animales estabulados con juguetes ya que alcanzaron valores similares a los adultos en este parámetro. Estos resultados apoyan los obtenidos previamente, en los que ratones muy viejos sometidos a EA con juguetes mejoran su respuesta proliferativa al LPS (Arranz *et al.*, 2010c) y demuestran la capacidad de ambas estrategias para paliar (en el caso de la hidroterapia) y revertir (en el caso de los juguetes) el deterioro que sucede al avanzar la edad en esta relevante función inmunitaria.

En relación a la **actividad citotóxica NK**, una función que también se deteriora con la edad (Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Puerto *et al.*, 2005; Martínez De Toda *et al.*, 2016), ésta aumenta de forma muy ligera pero no de forma estadísticamente significativa en los ratones viejos sometidos a EA, tanto con juguetes como con hidroterapia, con respecto a los controles viejos. Por lo tanto, ninguna de las dos estrategias parece ejercer un efecto positivo sobre esta función de defensa frente a infecciones víricas y procesos neoplásicos. En el caso del EA con juguetes, el resultado obtenido en el presente estudio contradice al obtenido por otros autores previamente (Benaroya-Milshstein *et al.*, 2004; Arranz *et al.*, 2010c) en los que el EA sí aumentaba esta función. No obstante, esta contradicción puede ser debida a diferencias que atañen al diseño así como metodológicas. De esta forma, en el caso del trabajo de Arranz *et al.* (2010c), realizado por nuestro grupo de investigación, sólo los ratones muy viejos que estuvieron sometidos al ambiente enriquecido con objetos entre 6 y 8 semanas previamente a las valoraciones inmunitarias experimentaron un aumento de la actividad NK, mientras que, en este caso, los animales viejos (de menor edad que los anteriores) sólo estuvieron expuestos 4-6 semanas. Por ello, la edad a la que se aplica el EA así como el tiempo

de exposición al mismo podrían subyacer a la ausencia de cambios significativos en el valor de la actividad NK obtenida en el presente estudio. Con respecto al por qué la hidroterapia tampoco parece ejercer efecto alguno sobre este parámetro en los ratones viejos es difícil de explicar, dada la ausencia de referencias bibliográficas previas. No obstante, dadas las similitudes entre los efectos de esta intervención y los observados con el EA con juguetes, pudiera ser que también el tiempo de tratamiento de baños no fuera suficiente para inducir cambio alguno en la actividad NK. Por lo tanto, el tiempo de exposición a ambas estrategias merecería tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

Algunos autores han descrito que una posible causa de los efectos positivos del EA sobre el sistema nervioso, endocrino e inmunitario podría radicar en la disminución del estrés oxidativo que éste induciría en determinadas regiones cerebrales (Fernández *et al.*, 2004; Muhammad *et al.*, 2017) y en las células inmunitarias (Arranz *et al.*, 2010c). Teniendo esto en cuenta y dado que con el envejecimiento se produce un desequilibrio entre compuestos oxidantes y antioxidantes, esto es, un estrés oxidativo, en las células inmunitarias que subyace a su inadecuado funcionamiento (Meydani *et al.*, 1995; De la Fuente y Miquel, 2009; Cannizzo *et al.*, 2011; Vida *et al.*, 2017), nos propusimos valorar la actividad de la enzima XO, que aumenta con el envejecimiento en los leucocitos de roedores (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011; 2014; 2017) así como la actividad enzimática CAT, que disminuye notablemente al avanzar la edad en las células inmunitarias de roedores (De la Fuente *et al.*, 2004b; Alonso-Fernández, 2006; Arranz *et al.*, 2010a; Gautam *et al.*, 2010; Vida *et al.*, 2017). Los resultados relativos a los parámetros de **estrés oxidativo** evaluados muestran que ambas estrategias de EA disminuyen significativamente la actividad de la enzima pro-oxidante **XO** y aumentan de forma notable la actividad enzimática antioxidante **CAT** en los leucocitos peritoneales, con respecto a los controles viejos, siendo estadísticamente significativa en el caso del uso de juguetes. Los valores que se obtuvieron se asemejan (o incluso son mayores, en el caso de la catalasa con EA de juguetes) a los controles adultos. Por tanto, la exposición a un ambiente enriquecido o someterse a la terapia de baños parece recuperar el equilibrio redox en las células inmunitarias, perdido en la vejez. Esto se traduciría en la mejora del funcionamiento de dichas células en los animales viejos enriquecidos como se observa en el presente estudio.

En resumen, la exposición durante un periodo corto de tiempo a un EA con juguetes recuperaría el equilibrio redox en las células inmunitarias lo que, finalmente, induciría una mejora e incluso revertiría (en algunos parámetros) el deterioro inmunitario asociado con la edad. Como consecuencia de ello, dicha estrategia podría disminuir la susceptibilidad y vulnerabilidad a infecciones en la vejez siendo éstas las causas más comunes de enfermedad y muerte en las personas de edad avanzada (Ginaldi *et al.*, 1999; Lord *et al.*, 2001; Fulop *et al.*, 2004; De la Fuente *et al.*, 2004b; 2005; 2008). Así mismo, el efecto de la hidroterapia sobre la inmunidad es similar al ejercido por el EA con juguetes por lo que, de nuevo, la hidroterapia se postula como una estrategia de EA válida para revertir la inmunosenescencia en las últimas etapas de la vida, asegurando un buen estado de salud.

Además, dado que muchas de las funciones valoradas en el presente estudio se han propuesto como marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016) nos planteamos si tanto el EA con juguetes como la hidroterapia podría alargar la supervivencia de los individuos viejos. En el diseño experimental utilizado, los objetos se mantuvieron de forma permanente hasta la muerte natural de los individuos, mientras que el grupo de hidroterapia dejó de recibir la misma y se mantuvo estabulado en condiciones estándar. Los resultados tras el análisis de la **longevidad media** mostraron que, a pesar de la mejora conductual e inmunitaria ejercida por ambas estrategias de EA en los ratones viejos, sólo los sometidos a 4 semanas de terapia de baños vivieron más que los controles no enriquecidos, por lo que dicha estrategia podría ser más determinante en el aumento de la esperanza de vida de los individuos. El hecho de que el EA con juguetes no haya alargado la vida de los ratones viejos ya ha sido descrito anteriormente (Arranz *et al.*, 2010c) y puede deberse a que estos animales no se adaptarían a tiempo al estrés que supone este tipo de enriquecimiento (Morimoto *et al.*, 1993; Toledo-Rodríguez y Sandi, 2011). Por el contrario, la exposición durante 4 semanas al protocolo de hidroterapia puede considerarse como un factor más estresante para los roedores que la introducción de juguetes en su lugar de estabulación ya que implica que los animales sean trasladados a un nuevo ambiente y expuestos a un medio acuático. Este estrés, que inicialmente podría ser negativo, podría terminar desencadenando en los individuos viejos una hormesis, particularmente en los sistemas reguladores, que finalmente resultaran en un beneficio para el estado de salud y un aumento de su supervivencia.

En conclusión, la exposición a un ambiente enriquecido con juguetes en la vejez durante un periodo corto de tiempo (4-6 semanas) produce una notable mejora de los parámetros de conducta y de función y de estrés oxidativo en las células inmunitarias, los cuales se deterioran con la edad. Esta mejoría indicaría que mantener una vida activa tanto física como intelectual en las últimas etapas de la vida aseguraría una vejez saludable y corroboraría los resultados previos obtenidos por otros autores. Así mismo, dadas las similitudes en cuanto a los efectos sobre el funcionamiento de los sistemas reguladores en la vejez entre el protocolo de EA con juguetes y la hidroterapia, se demuestra que la exposición puntual a ésta durante un periodo corto (4 semanas) puede ser considerada como una nueva estrategia de EA no sólo para mejorar la calidad de vida de los individuos de edad avanzada sino también para alargar su esperanza de vida.

### **5.4.2. Efecto del enriquecimiento ambiental con juguetes sobre la conducta de PAM y la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.**

Los efectos beneficiosos del EA introduciendo juguetes u objetos en la zona de estabulación de los roedores sobre el funcionamiento de los sistemas reguladores en la vejez, han sido demostrados por toda una serie de estudios (incluyendo el realizado en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis), demostrando su valía para revertir el deterioro conductual e inmunitario asociado con la edad. Por todo ello, nos planteamos si la exposición a un ambiente enriquecido con juguetes durante un periodo corto de tiempo (4-6 semanas) pudiera ejercer similares efectos positivos sobre la funcionalidad de los sistemas nervioso e inmunitario en el modelo de envejecimiento prematuro ya comentado previamente de los PAM. Como se ha indicado con anterioridad, los PAM manifiesta un declive significativo de los sistemas reguladores ya en la edad adulta con respecto a los NPAM, el cual es similar al presentado por ratones cronológicamente viejos (Vida y De la Fuente, 2013). Así mismo, los PAM manifiestan una menor longevidad con respecto a sus congéneres NPAM de igual edad cronológica (Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013). Dado que también se ha descrito que el EA con juguetes alarga la esperanza de vida de los individuos siempre y cuando se inicie en la edad adulta (Arranz *et al.*, 2010c), nos preguntamos si esta estrategia también alargaría la longevidad de los PAM expuestos a ella dado con se encuentran en la edad adulta.

Exponerse a un ambiente enriquecido supone una estimulación sensorial, cognitiva, motora e incluso social continuada (Van Praag *et al.*, 2000; Nithianantharajan y Hannan, 2006). De hecho, numerosos estudios han demostrado que el EA introduciendo objetos en la zona de estabulación en roedores induce toda una serie de modificaciones en los sistemas reguladores que, finalmente, se traducen en una mejora de su funcionamiento y en el mantenimiento de un buen estado de salud. Particularmente en la vejez, la exposición al EA (aun siendo ésta durante un tiempo corto) parece suponer una mejora de la calidad de vida en los individuos de edad avanzada (Arranz *et al.*, 2010c).

Con el fin de conocer los efectos del EA con juguetes sobre la conducta (y, por tanto, sobre la capacidad funcional del sistema nervioso) de los PAM, éstos se expusieron durante 4-6 semanas a un ambiente enriquecido para posteriormente someterse a un **estudio conductual**. En éste se evaluaron toda una serie de parámetros conductuales que permiten conocer las capacidades sensoriomotoras, la conducta de exploración espontánea y dirigida, así como las respuestas de ansiedad en todos los individuos del estudio. Con respecto a las **capacidades sensoriomotoras**, este EA en los PAM indujo una mejora de casi todos los parámetros analizados a este respecto, mostrando éstos un mayor equilibrio, coordinación motora y vigor muscular con respecto a los PAM no enriquecidos y alcanzando valores semejantes a los obtenidos en los NPAM. En cuanto al vigor muscular, la coordinación motora y la tracción, se ha demostrado que dichas habilidades sensoriomotoras se encuentran disminuidas en los PAM en relación a los NPAM (Guayerbas *et al.*, 2000; Guayerbas *et al.*, 2002b; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Vida y de la Fuente, 2013; Hernández, 2016) de forma similar al deterioro neuromuscular y la sarcopenia que suceden en el envejecimiento cronológico (Shukitt-Hale *et al.*, 1999; Butterfield *et al.*, 2004; Serrajd y Jamon, 2007; Edström *et al.*, 2007). Con respecto al equilibrio, éste aún no había sido determinado en los PAM y NPAM. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los PAM manifestaron un menor equilibrio con respecto a los NPAM, lo que podría deberse a alteraciones a nivel del cerebelo que suceden con la edad (Kennard *et al.*, 2013). Así, este dato apoyaría el déficit sensoriomotor mostrado por los PAM ya en la edad adulta, demostrando su senescencia conductual prematura. No obstante, carecemos hasta la fecha de datos que nos permitan demostrar que los PAM sufren ya en la edad adulta una alteración del cerebelo similar a la observada en los individuos de edad avanzada, lo que debería tenerse en cuenta en futuras

investigaciones. Por su parte, el EA con juguetes revierte este deterioro del equilibrio en los PAM, mostrando estos animales un equilibrio similar al observado en los NPAM.

Las **conductas exploratorias espontánea y dirigida** también se encuentran deterioradas en los PAM con respecto a los NPAM (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Vida y De la Fuente, 2013; Hernández, 2016), al igual que en individuos de edad avanzada en relación a los adultos (Belzung y Griebel, 2001; File y Seth, 2003; Francia *et al.*, 2006), y dicho deterioro en ambos parámetros se revierte en esos animales cuando se exponen a un ambiente enriquecido. Así, los resultados del presente subobjetivo indican que, en general, los PAM sometidos a EA experimentaron un aumento de su **actividad exploratoria espontánea**, tanto horizontal como vertical, con respecto a los PAM estabulados en condiciones estándar, asemejándose a los valores mostrados por los NPAM. En este punto, cabe destacar que, en el “tablero de agujeros”, tanto los NPAM como los PAM expuestos a EA exhibieron una actividad exploratoria espontánea similar a la de los PAM no enriquecidos. Este resultado podría contradecir lo comentado anteriormente en cuanto a que los PAM se caracterizan por una menor capacidad de exploración con respecto a los NPAM (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Vida y De la Fuente, 2013; Hernández, 2016). No obstante, atendiendo a los resultados de la **conducta exploratoria dirigida** en el “tablero de agujeros”, se observa que tanto los NPAM como los PAM sometidos a un ambiente enriquecido realizaron más exploraciones activas de los agujeros, dedicando un mayor tiempo a las mismas durante la duración de la prueba, en relación a los PAM controles. Esta mayor dedicación a la conducta de exploración dirigida manifestada por los NPAM y los PAM expuestos a EA podría subyacer a la ausencia de diferencias en la exploración espontánea en dicha prueba obtenida en el presente estudio. Por tanto, y al igual que lo observado en algunos de los resultados extraídos del subobjetivo 4.1. en los ratones viejos expuestos al mismo protocolo de EA con juguetes, se vuelve a demostrar que la exposición a un ambiente enriquecido potencia la capacidad de exploración en los roedores (Escorihuela *et al.*, 1994; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Harati *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014).

Por otro lado, uno de los efectos más claros del EA sobre la conducta es su capacidad para reducir los niveles de ansiedad,



observado por numerosos estudios (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Pena *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2006; Leal-Galicia *et al.*, 2008; Arranz, 2009; Harati *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2015; Leger *et al.*, 2015), incluyéndose el realizado en el subobjetivo 4.1. en ratones viejos de la presente Tesis. Los PAM se caracterizan por mostrar unos elevados niveles de ansiedad en relación a los NPAM (Viveros *et al.*, 2001; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Hernández, 2016), lo cual también es característico de los individuos de edades avanzadas (Belzung y Griebel, 2001; File y Seth, 2003; Francia *et al.*, 2006). En el presente estudio conductual, los resultados corroboran el efecto ansiolítico del EA anteriormente mencionado, puesto que los PAM expuestos a un ambiente enriquecido manifestaron menores **respuestas de ansiedad** con respecto a los PAM controles, exhibiendo una mayor deambulación interna con respecto a la total, una menor tigmotaxia, una mayor conducta de acicalamiento así como tardaron menos tiempo en abandonar el punto de partida en el “campo abierto”. Además, en algunos de estos parámetros, los valores de los PAM sometidos a EA con juguetes fueron similares a los obtenidos en los NPAM. Teniendo en cuenta todo ello, los resultados demuestran de nuevo que el EA es capaz de revertir la mayor emotividad y ansiedad características de los PAM, lo que podría explicar su mejor respuesta ante situaciones novedosas y estresantes como son las diferentes pruebas de conducta analizadas.

Como se comentó en el anterior subobjetivo de la presente Tesis, el EA ejerce toda una serie de efectos beneficiosos sobre los sistemas nervioso y endocrino en la vejez, y consecuentemente, sobre la conducta de los individuos. Así, roedores viejos sometidos a EA experimentan una mejora de la actividad de los sistemas dopaminérgico y colaminérgico (Paban *et al.*, 2005; Segovia *et al.*, 2009), aumentan la expresión de factores neurotróficos así como mantienen preservados los procesos de neurogénesis (Mora *et al.*, 2007; 2013). Además, el EA también mejora la funcionalidad del eje HHA (Garrido, 2011; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014), de la que se ha descrito que se deteriora con la edad (Sapolsky *et al.*, 1987; Lupien *et al.*, 2001; Tizabi *et al.*, 2003; Aguilera, 2011). Por su parte, en los PAM se han descrito alteraciones en algunos de estos procesos, que se asemejarían a las manifestadas al avanzar la edad y que corroborarían su envejecimiento prematuro en cuanto al sistema nervioso y endocrino. Concretamente, los ratones prematuramente envejecidos ya en edades tempranas (juvenil y adulta) manifiestan una mayor concentración basal de corticosterona (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005)

además de alteraciones en los niveles de monoaminas en distintas regiones cerebrales (como un menor contenido de DA) en comparación con los NPAM (De la Fuente *et al.*, 2003), lo que contribuiría a sus déficits locomotores y a su inadecuada adaptación a situaciones novedosas o estresantes. Teniendo en cuenta que el EA es capaz de actuar sobre dichos procesos característicos de la vejez, como se ha comentado con anterioridad, la mejora e incluso la reversión del deterioro conductual observada en el presente estudio en los PAM estabulados en un ambiente enriquecido con juguetes, podría deberse al efecto de dicha estrategia para atenuar o incluso revertir las alteraciones a nivel cerebral y del eje HHA descritas en estos animales. También este EA podría mejorar otros procesos que pudieran estar modificados en los PAM, como la neurogénesis o la expresión de factores neurotróficos, y que se sabe lo están en la vejez. Todo ello debería tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

Los efectos beneficiosos del EA con juguetes sobre el funcionamiento de los sistemas nervioso y endocrino son evidentes, no sólo basándose en las observaciones de anteriores estudios sino también en los resultados que se han ido obteniendo a lo largo del presente objetivo de esta Tesis en los ratones viejos así como en los PAM. Así mismo, y dada la existencia de la comunicación psiconeuroinmunendocrina, la capacidad del EA para revertir el deterioro conductual y cognitivo asociado con la edad (Mattson *et al.*, 2001; Mora *et al.*, 2007; Segovia *et al.*, 2009; Mora, 2013) podría incidir revertiendo la inmunosenescencia en ratones viejos, de acuerdo a lo obtenido por otros autores (Arranz *et al.*, 2010c). Así mismo, se ha propuesto que dicha mejora de la funcionalidad del sistema inmunitario sería consecuencia de la capacidad del EA para disminuir los oxidantes y aumentar los antioxidantes en los leucocitos, asegurando el mantenimiento de un adecuado equilibrio redox, básico para el funcionamiento de estas células (Arranz *et al.*, 2010c). Ambos hallazgos, esto es, una reversión del deterioro funcional debido al envejecimiento de las células inmunitarias junto con un adecuado mantenimiento del equilibrio redox en las mismas se han observado también en los resultados obtenidos en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis en los ratones viejos expuestos a EA durante un tiempo corto. Teniendo esto en cuenta, nos planteamos si este protocolo de EA con juguetes también mejoraría la función inmunitaria y el estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales de los PAM adultos.

En cuanto a las **valoraciones inmunitarias**, los resultados muestran que los PAM expuestos a EA experimentan una mejora general en la mayoría de los parámetros evaluados, los cuales se encuentran deteriorados en estos animales ya en edades tempranas con respecto a los NPAM de igual edad (Viveros *et al.*, 2001; Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; Guayerbas *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; De la Fuente, 2010; Martínez de Toda *et al.*, 2016). Además, confirmando su envejecimiento prematuro, dicho declive inmunitario se asemeja a lo observado en los ratones cronológicamente viejos (Niwa *et al.*, 1989; Ferrández *et al.*, 1999; Guayerbas *et al.*, 2002b; Ortega *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2002; Guayerbas y De la Fuente, 2003; De la Fuente *et al.*, 2004a; Puerto *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda, 2016). Así, en relación a las **funciones** analizadas en los **macrófagos** peritoneales en el presente estudio, los resultados muestran que los PAM expuestos a un ambiente enriquecido manifiestan mayores **quimiotaxis** y **fagocitosis** con respecto a los PAM no enriquecidos, acercándose o incluso asemejándose a los valores obtenidos en los NPAM. Estos datos concuerdan no sólo con los observados en los ratones viejos sometidos a EA del subobjetivo 4.1. de la presente Tesis sino también con los obtenidos en otros estudios previos llevados a cabo en la vejez (Arranz *et al.*, 2010c). Por lo tanto, la exposición durante un tiempo corto a un ambiente enriquecido con juguetes es capaz de revertir el deterioro de la movilidad de los macrófagos hacia el foco de infección así como la capacidad de ingerir material extraño de dichas células en los PAM, que muestran un deterioro de ambas funciones ya en la edad adulta (Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2002b; Guayerbas *et al.*, 2004; Alvarado *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2006a, Vida y De la Fuente, 2013; Martínez De Toda *et al.*, 2016).

Por su parte, las **funciones linfocitarias**, como la quimiotaxis y la respuesta proliferativa a mitógenos, también se encuentran deterioradas en los PAM en edades tempranas con respecto a los NPAM (Guayerbas *et al.*, 2002a; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013; Martínez De Toda *et al.*, 2016), de igual modo que sucede al envejecer (Inkeles *et al.*, 1977; Gillis *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Simioni *et al.*, 2007; De la Fuente *et al.*, 2008a; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez De Toda *et al.*, 2016;). El EA con juguetes llevado a cabo en el presente subobjetivo demuestra su capacidad para revertir el deterioro de la **quimiotaxis** y de la

**respuesta proliferativa** de los linfocitos T al mitógeno **ConA** en relación a los PAM control, alcanzando niveles similares a los obtenidos en los NPAM, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente en ratones viejos (Arranz *et al.*, 2010c) y en el subobjetivo 4.1. del presente trabajo. Concretamente, esa menor respuesta proliferativa de los linfocitos T a la ConA, se ha relacionado con una menor liberación del factor de crecimiento autocrino de las células T, la **IL2** observado tanto en los PAM (Alvarado *et al.*, 2005; 2006a; Álvarez *et al.*, 2006) como en ratones de edad avanzada (Guayerbas *et al.*, 2002b; Pawelec *et al.*, 2002). Los resultados del presente estudio en relación a la concentración de IL2 liberada por los leucocitos peritoneales en cultivo en presencia de ConA muestran un aumento de dicha concentración en los PAM expuestos a EA con respecto a los PAM no enriquecidos, superando incluso a la mostrada por los NPAM. Este aumento de la secreción de IL2 debida al EA en los PAM, podría subyacer a la mayor respuesta proliferativa a la ConA de los linfocitos observada en estos animales así como en los NPAM, en comparación con los PAM no enriquecidos. Así mismo, tanto el aumento de la concentración de IL2 en respuesta a ConA como la consecuente mayor proliferación de los linfocitos peritoneales en presencia de dicho estímulo observados en los PAM sometidos a EA, coincide con lo observado previamente en ratones viejos expuestos a un ambiente enriquecido (Arranz *et al.*, 2010c). No obstante, en cuanto a la proliferación de los linfocitos en presencia de **LPS**, que se ha demostrado mermada en los ratones prematuramente envejecidos (Guayerbas *et al.*, 2002a; Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013) así como con el envejecimiento fisiológico (Medina *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2004a; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010a) el protocolo de EA no indujo cambio alguno en dicho parámetro en los PAM, manifestando éstos un valor similar al obtenido en los PAM no enriquecidos. Este resultado parece contradecir a los resultados observados en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis, en el que los linfocitos de los ratones viejos expuestos a EA con juguetes sí manifestaron una mayor respuesta proliferativa en presencia de LPS, así como con datos previamente obtenidos en ratones muy viejos (Arranz *et al.*, 2010c). No obstante, sin disponer de resultados que nos lo confirmen, parece ser que la edad a la que se expone al individuo al EA podría jugar un papel importante en este parámetro. Así, en el experimento llevado a cabo por Arranz *et al.* (2010c), los linfocitos peritoneales cultivados en presencia de LPS procedentes de ratones viejos (de 17±1 meses de edad) sometidos a EA no experimentaron mejora alguna en su

respuesta de proliferación a dicho mitógeno con respecto a los individuos viejos no enriquecidos. Teniendo esto en cuenta, si bien el EA sí mejora la funcionalidad de los linfocitos peritoneales en los PAM, quizás no puede ejercer efecto sobre la respuesta proliferativa al LPS porque estos animales no dejan de ser cronológicamente adultos. No obstante, el resultado fisiológico de este dato es difícil de explicar y merecería, por ello, futuras investigaciones.

En cuanto a la **actividad citotóxica NK**, una importante defensa frente a infecciones víricas y procesos neoplásicos, los resultados muestran que el protocolo de EA en los PAM induce una significativa mejora en sus niveles con respecto a los de los PAM no enriquecidos, alcanzando un valor similar al observado a los NPAM. Por tanto, el EA con juguetes de corta duración (4-6 semanas) también es capaz de revertir el deterioro de la actividad NK característico de los PAM (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2006; Alvarado *et al.*, 2006a; Arranz *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2009a; Vida y De la Fuente, 2013; Martínez De Toda *et al.*, 2016), así como de individuos de edad avanzada (Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Puerto *et al.*, 2005; Martínez De Toda *et al.*, 2016), lo cual concuerda con los obtenidos en estudios previos (Benaroya-Milshstein *et al.*, 2004; Arranz *et al.*, 2010c).

Por su parte, se sabe que el EA promueve una disminución del estrés oxidativo en el cerebro (Fernández *et al.*, 2004; Muhammad *et al.*, 2017) así como en las células inmunitarias en la vejez (Arranz *et al.*, 2010c), último punto también observado en los leucocitos de los ratones viejos expuestos a EA del subobjetivo 4.1. de la presente Tesis. De hecho, esta capacidad del EA de promover un adecuado equilibrio redox, podría subyacer a los efectos beneficiosos que ejerce sobre la funcionalidad de los sistemas reguladores. Dado que los PAM manifiestan ya en la edad adulta un desequilibrio entre compuestos oxidantes y antioxidantes en sus células inmunitarias (Alvarado *et al.*, 2006a; 2006b; Viveros *et al.*, 2007; Vida y De la Fuente, 2013), similar al que sucede en el envejecimiento fisiológico (Vida *et al.*, 2014), nos propusimos valorar la actividad de la enzima **XO** en los leucocitos peritoneales del presente estudio. Los resultados muestran que los leucocitos de los PAM expuestos a un ambiente enriquecido presentan una actividad XO significativamente menor que la de los PAM no enriquecidos, alcanzando el valor de los NPAM. La XO es una enzima que, como consecuencia de su acción, genera gran cantidad de compuestos oxidantes, y cuya actividad se encuentra aumentada en los

PAM adultos con respecto a los NPAM (Vida y De la Fuente, 2013) así como en los ratones viejos cronológicos (Arranz *et al.*, 2010a; Vida *et al.*, 2011; 2014; 2017). Por lo tanto, la disminución de su actividad enzimática en los leucocitos de los PAM inducida por el EA indicaría que este protocolo es capaz de disminuir el estrés oxidativo en dichas células, contribuyendo a su mejora funcional. Hecho que concuerda con lo anteriormente probado en ratones viejos (Arranz *et al.*, 2010c), incluyéndose los pertenecientes al subobjetivo 4.1. de la presente Tesis.

En suma, el presente protocolo de EA revierte el deterioro conductual e inmunitario así como reduce el estrés oxidativo de los leucocitos característico de los PAM de edad adulta, debidos a su envejecimiento prematuro. Dado que la mayoría de las funciones inmunitarias valoradas en el presente subobjetivo se consideran marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016), dichos resultados indican que el EA reduciría la mayor edad biológica de los PAM. Además, el hecho que confirma a los PAM como un modelo de envejecimiento prematuro, además de su deterioro nervioso e inmunitario, es que viven significativamente menos que los NPAM (Guayerbas *et al.*, 2002a; 2002b; Guayerbas y De la Fuente, 2003). Teniendo en cuenta que Arranz *et al.* (2010) describieron que ratones expuestos desde su edad adulta a EA con juguetes incrementaron su esperanza de vida con respecto a los estabulados en condiciones estándar mientras que si éstos se exponían a dicha estrategia a partir de edades más avanzadas (vejez) no se observaba cambio alguno en la longevidad de los individuos, nos planteamos si exponer a los PAM, ratones prematuramente envejecidos, desde la edad adulta a EA con juguetes pudiera alargar su esperanza de vida. Los resultados del análisis de la **longevidad media** realizados en el presente estudio indican que los PAM expuestos a un EA desde su edad adulta viven significativamente más que los PAM estabulados sin enriquecimiento, alcanzando una longevidad similar a la de los NPAM.

En conclusión, la exposición de los PAM a un ambiente enriquecido con juguetes durante un periodo corto de tiempo (4-6 semanas) revierte el deterioro conductual así como de función y de estrés oxidativo de las células inmunitarias que dichos animales ya muestran en la edad adulta, y que es similar por ratones cronológicamente viejos. Además, los PAM expuestos a un ambiente enriquecido también viven significativamente más. Por tanto, estos

resultados demuestran la valía del EA como una potente estrategia para reducir la edad biológica, esto es frenar la velocidad de envejecimiento del individuo y, consecuentemente, alargar su esperanza de vida. Dado que en la edad adulta puede haber sujetos con una alta edad biológica, el EA sería recomendable como estrategia de estilo de vida desde esa edad.

### **5.4.3. Efecto del enriquecimiento ambiental con hidroterapia sobre los niveles de ansiedad y la función de leucocitos en ratones viejos aislados. Efectos sobre la longevidad.**

Como ya se demostró en el subobjetivo 3.3. de la presente Tesis, los ratones viejos estabulados en condiciones de aislamiento social manifiestan un deterioro inmunitario con respecto a los ratones estabulados en grupo de igual edad, acelerando su senescencia y acortando su esperanza de vida. Además, los resultados del subobjetivo 4.1. del presente trabajo indican que una exposición puntual a la hidroterapia (durante 4 semanas) se postula como una potente estrategia de EA capaz de reducir los niveles de ansiedad así como de mejorar e incluso revertir el declive inmunitario asociado con la edad. Así mismo, esta intervención alargó la vida de los ratones viejos expuestos a ella. Teniendo en cuenta todo ello, en el presente subobjetivo nos propusimos saber si un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración sería capaz de ejercer el efecto beneficioso anteriormente mencionado sobre algunas funciones de leucocitos peritoneales de ratones viejos aislados socialmente durante 4 semanas. En este punto, cabe destacar que en el presente diseño los ratones aislados se exponen a un doble enriquecimiento. Por un lado, la hidroterapia y, por otro, un enriquecimiento social ya que los individuos realizan dicha terapia de baños en grupo. Ambas intervenciones se deberán tener en cuenta a la hora de discutir los resultados obtenidos.

En cuanto a los **niveles de ansiedad** mostrados por los ratones viejos aislados antes y después de la terapia de baños, evaluados en el “laberinto en cruz elevado”, se observa que dicha intervención ejerció un efecto ansiolítico en los ratones aislados, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis en el que los ratones viejos sometidos al mismo protocolo de hidroterapia vieron reducidas sus respuestas de ansiedad en diferentes pruebas conductuales. Esta reducción de los niveles de ansiedad concuerda con el efecto ansiolítico que se sabe induce el EA (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Pena *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2006; Leal-Galicia *et al.*, 2008;

Arranz, 2009; Harati *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2015). No obstante, algunos autores han descrito como ratas hembra adultas sometidas únicamente a enriquecimiento social (estabuladas en pareja) durante 3 semanas no experimentaron cambio alguno en su conducta, incluyendo las respuestas de ansiedad (Beck y Luine, 2002). Por tanto, parece que la conjunción de ambos tipos de enriquecimiento (físico y social), como el que reciben en el presente estudio los ratones viejos aislados, es necesaria para que los roedores vean reducidos sus niveles de ansiedad y, en general, su conducta (Pena *et al.*, 2009; Emack y Matthews, 2011; Harati *et al.*, 2012). No obstante, los efectos tanto del enriquecimiento físico como social sobre la conducta de los roedores siguen siendo controvertidos, tanto en cuanto pueden actuar sobre los resultados que se obtengan numerosos factores como la cepa, el sexo, la edad a la que se aplican, el tiempo de exposición, etc. Por ello, las consecuencias en el comportamiento de la conjunción de ambos tipos de EA aún son menos conocidas, lo que merecería tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

En cuanto a las **funciones** analizadas en los **macrófagos** peritoneales, se observa que el aislamiento redujo de forma significativa la capacidad de movilidad hacia el foco de infección o **quimiotaxis** de estas células con respecto a los animales que viven en grupo, lo que concurre con los resultados obtenidos en el subobjetivo 3.3. en los ratones viejos aislados así como con los de otros estudios en estrés crónico (Dhabhar and McEwen, 1997; Dhabhar, 2013). Esto se ha postulado que puede ser consecuencia de una inadecuada respuesta de los macrófagos a las hormonas del estrés, particularmente a las catecolaminas, al igual que sucede en el envejecimiento (Ortega *et al.*, 2000b; 2000c) cuyas concentraciones se verían alteradas debido al aislamiento social (Gavrilovic *et al.*, 2010). No obstante, a pesar de que la hidroterapia en grupo aumentó la quimiotaxis de los macrófagos de los ratones viejos expuestos a ella en el subobjetivo 4.1. del presente trabajo, dicha estrategia no parece ser eficaz para mejorar dicho parámetro en los ratones aislados expuestos a la terapia de baños grupal.

Por su parte, la **función linfocitaria** también se ve afectada por el aislamiento social mientras que la hidroterapia grupal mejora e incluso revierte esta deficiente actividad de los linfocitos peritoneales inducida por el mencionado estrés psicológico. Así, los linfocitos de los ratones viejos aislados sometidos a la terapia de baños en grupo presentaron una mayor **capacidad quimiotáctica** en relación no sólo



a los aislados no expuestos a esta intervención, sino también a los ratones viejos que viven agrupados, ya que el aislamiento social no induce ningún cambio en la capacidad de migración de los linfocitos peritoneales (hecho observado previamente en los resultados obtenidos en subobjetivo 3.3. de la presente Tesis). Este hallazgo indicaría que el enriquecimiento social continuado, por vivir en grupo, no es suficiente para inducir cambios en la quimiotaxis de los linfocitos. Por tanto, parece que es el EA físico puntual (la hidroterapia) el responsable de potenciar este parámetro, revirtiendo incluso el deterioro en el mismo debido al envejecimiento (Ortega *et al.*, 2000a; De la Fuente *et al.*, 2004a; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez de Toda *et al.*, 2016) ya que los niveles de quimiotaxis son incluso superiores a los observados en los ratones viejos estabulados en grupo. Con respecto a los resultados de la **capacidad de proliferación** en respuesta a mitógenos, que mimetiza *in vitro* la respuesta de las células inmunitarias *in vivo* a los antígenos, se observa que la disminución significativa de la respuesta proliferativa de los linfocitos B y T debida al aislamiento social a los mitógenos **LPS** y **ConA**, se revierte en los animales aislados expuestos a hidroterapia grupal. De este modo, estos animales muestran valores que se acercan o se igualan a los observados en los ratones viejos estabulados en grupo. Por tanto, el protocolo puntual de hidroterapia en grupo es capaz de atenuar la senescencia acelerada inducida por el aislamiento social que afecta a la respuesta proliferativa de los linfocitos a los mitógenos, previamente demostrada por otros autores (Kiecolt-Glaser *et al.*, 1984b; Lu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000) así como por los resultados obtenidos en los ratones viejos aislados del subobjetivo 3.3. de la presente Tesis.

Finalmente, tanto en el subobjetivo 3.3. como en el presente, el aislamiento social en la vejez produjo un ligero descenso de la **actividad citotóxica NK** sin llegar a ser estadísticamente significativo, al contrario de lo observado por otros autores (Arranz *et al.*, 2010c). De forma similar, la hidroterapia en grupo en los animales aislados parece inducir cierta mejora de esta importante función inmunitaria, sin alcanzar ésta la significación estadística. Al igual que se comentó en el subobjetivo 4.1., en el que este protocolo de hidroterapia no indujo cambio significativo en la actividad NK de los leucocitos peritoneales de los ratones viejos, pudiera ser que el tiempo de exposición a esta estrategia no fuera suficiente para modificar dicha actividad.

Por su parte, tras las valoraciones inmunológicas, todos los animales del estudio se mantuvieron estabulados en similares

condiciones, sin volver a recibir los aislados ninguna intervención, hasta su muerte natural para analizar los efectos de la hidroterapia sobre la **longevidad** media. Los resultados relativos a la misma indican que este protocolo de hidroterapia en grupo alargó significativamente la esperanza de vida de los ratones viejos aislados en relación a los ratones viejos aislados que nunca recibieron tal estrategia de EA, alcanzando aquellos un valor similar al mostrado por los animales estabulados en grupo. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis, en el que los ratones viejos sometidos a hidroterapia viven más que los ratones estabulados en condiciones estándar, así como con los observados en el subobjetivo 3.3., que apuntan a que el aislamiento social en la vejez supone una menor esperanza de vida para los individuos que lo padecen.

Dada la ausencia de referencias bibliográficas respecto a los efectos del EA social y, sobre todo, de la hidroterapia sobre la funcionalidad del sistema inmunitario, se hace difícil dar una explicación fisiológica a los datos sobre la inmunidad obtenidos en los ratones viejos aislados expuestos a la terapia de baños aquí aplicada. A pesar de ello, se sabe que el aislamiento social induce en los individuos una mayor inflamación y oxidación (Hackett *et al.*, 2012; Jaremka *et al.*, 2013; Colaianna *et al.*, 2013) que subyacería al deterioro de salud que les caracteriza. Además, como se ha comentado a lo largo de la presente Tesis, el establecimiento de un estrés inflamatorio y oxidativo crónico en las células inmunitarias, al igual que ocurre con el envejecimiento (De la Fuente y Miquel, 2009), supone un deterioro de sus capacidades. Por todo ello, se ha postulado que en los individuos aislados se establecería una inflamación así como un aumento del estrés oxidativo que subyacería a las alteraciones inmunitarias asociadas al mismo, lo cual se ha ido corroborando a lo largo de los diversos estudios realizados al respecto en el objetivo 3 de la presente Tesis. Teniendo en cuenta todo ello y que la hidroterapia parece inducir, al igual que el EA con juguetes, un aumento de los compuestos antioxidantes acompañado de un descenso de los oxidantes, la mejora observada en el presente subobjetivo, en la mayoría de los parámetros de función inmunitaria, de los ratones viejos aislados que se someten a hidroterapia podría deberse a que dicha estrategia atenúa la mayor inflamación y oxidación que pudieran estar atravesando éstos, lo que merecería futuras investigaciones. En este sentido, cabe destacar que en los resultados se observa que la hidroterapia en grupo indujo en los animales aislados una significativa disminución de la **proliferación basal** o en reposo de los linfocitos con respecto a los aislados no

enriquecidos, asemejándose a los valores obtenidos en los agrupados. Dicha disminución de los valores en este parámetro, apuntarían que la estrategia revierte lo que se ha denominado “inflamación estéril” en estado de reposo (Franceschi *et al.*, 2000a; Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007; Rock *et al.*, 2010) que presentan los aislados. Sin embargo, se hace necesario realizar más estudios a este respecto para conocer si realmente la hidroterapia grupal reduce los niveles de oxidación e inflamación de los leucocitos de los individuos aislados para así poder asegurar que este proceso subyace a los efectos positivos de la misma sobre la inmunidad. Además, cabe añadir que el presente estudio supone una primera aproximación del estudio del impacto de la hidroterapia sobre la función inmunitaria en el aislamiento social en la vejez por lo que, con el fin de profundizar en los mismos, en futuras investigaciones habría que considerar una serie de factores que pueden influir. Así, en la presente Tesis se ha descrito que la respuesta emocional de ansiedad al aislamiento social puede variar sus efectos sobre el funcionamiento de los sistemas reguladores, incluyendo el sistema inmunitario, por lo que sería interesante en futuros estudios conocer si la hidroterapia pudiera también ejercer diferentes acciones no sólo sobre la inmunidad sino también sobre la conducta en función de los niveles de ansiedad manifestados por los ratones aislados (y no aislados) sometidos a la misma. También, con el objetivo de profundizar y discernir sobre los efectos del enriquecimiento social y físico inducidos por la hidroterapia en los animales aislados, sería interesante someter a ratones aislados a esta terapia de baños de forma individual y no grupal y, paralelamente, exponer a animales aislados a un enriquecimiento social (hacer que convivieran).

En conclusión, la exposición puntual a un enriquecimiento físico y social, como es la terapia de baños aquí empleada, durante un corto periodo de tiempo (4-6 semanas de duración) en la vejez mejora notablemente los parámetros inmunitarios, especialmente de los linfocitos peritoneales, que se encuentran deteriorados por efecto del aislamiento social en los ratones viejos. Esta mejoría podría subyacer a que dicha estrategia parece reducir el estrés oxidativo así como la aparente inflamación de base que afecta a las células inmunitarias de los individuos aislados. Teniendo en cuenta que las funciones inmunitarias aquí evaluadas se consideran marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016), podría decirse que la hidroterapia en grupo es capaz de disminuir la edad biológica de los individuos aislados, los cuales presentan una

aceleración de su envejecimiento. De este modo, la hidroterapia podría proponerse como una estrategia para conseguir una longevidad saludable.

### **5.4.4. Efectos del enriquecimiento ambiental con hidroterapia con agua mineralo-medicinal sobre la conducta y parámetros de función y de estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros y viejos.**

Como se ha podido demostrar a lo largo de este 4º Objetivo de la presente Tesis, la hidroterapia se postula como una nueva estrategia de EA válida para frenar e incluso revertir el deterioro conductual e inmunitario que se produce en el envejecimiento, tanto fisiológico como acelerado. Dentro de los efectos de la hidroterapia (Nasermoaddeli y Kagamimori, 2005), se destacarían los efectos químicos, que vendrían determinados por la composición mineral del agua empleada, que les denomina y confiere una propiedades específicas (bicarbonatadas, sulfatadas, cloruradas, sódicas, cálcicas, magnésicas). A este último respecto, las aguas mineralo-medicinales que contienen azufre como componente principal ejercen una serie de efectos terapéuticos, que se conocen por las observaciones clínicas, e incluyen efectos antirreumáticos, antialérgicos, desintoxicantes, anti-inflamatorios o antipruriginosos (San Martín y Armiejo-Castro, 1994; Ghersetich y Lotti, 1996; Albertini et al., 2008). Así mismo, también se ha propuesto que este tipo de aguas mineralo-medicinales podría mejorar el estado redox, habiéndose observado una disminución de marcadores de oxidación en individuos sometidos a hidroterapia con aguas ricas en sulfuros (Scheidleder et al., 2000; Ekmekcioglu et al., 2002; Leibetseder et al., 2004; Hernández-Torres et al., 2004; Benedetti et al., 2009). Como se ha comentado, prácticamente se desconocen los efectos de la hidroterapia, y menos con aguas mineralo-medicinales sulfuradas, sobre la funcionalidad de los sistemas reguladores (nervioso, endocrino e inmunitario), especialmente en la vejez, si bien los escasos resultados que se tienen al respecto ya apuntan a que estamos ante una estrategia con gran potencial para ralentizar el envejecimiento y contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud en la vejez. Además, entre los distintos tipos de antioxidantes, uno de los más relevantes es el glutatión, cuya actividad frente a los oxidantes radica en el grupo tiólico de su cisteína que protege de la oxidación a los grupos -SH- de las proteínas. Al actuar, el glutatión en su forma reducida (GSH) pasa a la oxidada (GSSG), la cual contiene puentes disulfuro. Dado el

importante papel del glutatión para proteger a las biomoléculas de daño oxidativo, lo cual subyace al envejecimiento (Miquel *et al.*, 1980; Miquel, 1998; Pamplona y Barja, 2003; Barja, 2004; De La Fuente y Miquel, 2009), la administración de GSH o de precursores o moduladores del mismo, como sería el caso de las aguas ricas en sulfuro, podría prevenir el deterioro funcional asociado a la edad de los sistemas reguladores, incluyéndose el sistema inmunitario. De hecho, se ha descrito que una función inmunitaria adecuada requiere niveles adecuados de glutatión (Arranz *et al.*, 2008). Por todo ello, en el presente subobjetivo nos planteamos una primera aproximación al estudio de los efectos de una hidroterapia de 2 semanas de duración con aguas sulfuradas sobre la conducta, que reflejaría el funcionamiento del sistema nervioso, y la función y el estrés oxidativo de leucocitos de ratones en dos momentos del proceso de envejecimiento: una etapa temprana, como lo es la edad madura, así como en un estado más avanzado de este proceso, la vejez.

Para conocer los efectos de esas 2 semanas de tratamiento de baños con aguas sulfuradas sobre la funcionalidad del sistema nervioso, los ratones del estudio realizaron una batería de pruebas conductuales para valorar parámetros tales como las capacidades sensoriomotoras, la exploración espontánea y dirigida y las respuestas de ansiedad. Los resultados de este **estudio conductual** indican que la hidroterapia *per se* produjo una mejora general de algunas **capacidades sensoriomotoras**, como el vigor muscular, la coordinación motora y la tracción, tanto en los animales maduros como viejos, con respecto a los valores observados en los ratones no sometidos a terapia de baños de su misma edad. Estos datos, al menos los referidos a la coordinación motora, corroboran lo obtenido en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis en los ratones viejos, y que se ha relacionado con el efecto del EA para mejorar la respuesta de los individuos a los ambientes nuevos y estresantes (Pena *et al.*, 2006; Arndt *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Schloesser *et al.*, 2010; Sampietro-Piquero *et al.*, 2014). Además, los efectos de la hidroterapia con aguas sulfuradas, parecen depender de la edad a la que se apliquen. Así, los ratones maduros que se bañaron en agua sulfurada mostraron una mejora más marcada en algunas de las capacidades sensoriomotoras evaluadas en el presente estudio, manifestando mayores vigor muscular, coordinación motora y tracción que los ratones maduros bañados en agua corriente. Por el contrario, en el caso de los animales viejos, la aplicación de aguas sulfuradas no modificó los efectos beneficiosos que ya ejerce la hidroterapia con agua corriente sobre las

capacidades sensoriomotoras. Este diferente impacto de la hidroterapia con aguas sulfuradas en función de la edad, también se observa en la conducta de **exploración**, de modo que los ratones maduros bañados en el agua mineralo-medicinal manifestaron una mayor exploración espontánea vertical así como dirigida, no sólo con respecto a los maduros no bañados, sino también de forma más notable que lo observado en los animales de su misma edad sometidos a hidroterapia con agua corriente. Por el contrario, los efectos beneficiosos de la hidroterapia tanto con agua normal como con agua mineralo-medicinal en la exploración espontánea fueron menores en los ratones viejos. Dado que no existen referencias bibliográficas directas, la explicación de este efecto de las aguas sulfuradas dependiente de la edad se hace difícil de explicar. No obstante, podría deberse a la acción indirecta sobre los antioxidantes que tendría esta agua sulfurada, y más concretamente sobre el glutatión. Así, en los ratones maduros en los que no se habría establecido aún un descenso marcado de los niveles de antioxidantes como el glutatión (Ravindranath *et al.*, 1989), la hidroterapia con agua sulfurada de 2 semanas de duración supondría un tiempo suficiente para aumentar los niveles de este antioxidante en determinadas áreas cerebrales y, por tanto, para ejercer ese mayor beneficio sobre las capacidades sensoriomotoras y la exploración que la hidroterapia con agua normal observada en el presente estudio. Por su parte, en el caso de los ratones viejos, éstos se encontrarían en una fase del proceso de envejecimiento muy establecida. En este sentido, se ha descrito que ratas viejas manifiestan un descenso notable de la concentración de GSH en el cerebro y, por tanto, una menor capacidad antioxidante con respecto a las jóvenes y maduras (Ravindranath *et al.*, 1989). Por lo tanto, el hecho de que la hidroterapia con aguas sulfuradas no ejerza un beneficio mayor que la terapia de baños con agua corriente en los ratones viejos del presente estudio, podría deberse a que en éstos el déficit de antioxidantes a nivel del sistema nervioso, y de glutatión en particular, es tal que 2 semanas de administración tópica de sulfuro mediante esta estrategia de hidroterapia no podría revertir o aumentar dichos niveles, no observándose modificación alguna en la conducta de los individuos viejos sometidos a la misma. Además, cabe destacar en cuanto a la **conducta de exploración dirigida**, que en los ratones viejos ninguno de los dos tipos de hidroterapia indujo cambio alguno en la misma, a diferencia de lo observado en el tratamiento de baños de 4 semanas de duración. del subobjetivo 4.1. de la presente Tesis. Este hallazgo puede apuntar a que los beneficios de la hidroterapia pudieran depender también del tiempo de aplicación de la misma, por

lo que una exposición a esta intervención durante 2 semanas en los animales viejos no sería suficiente para inducir una mejora significativa en esta conducta.

En cuanto a las **respuestas de ansiedad** evaluadas, cabe destacar que en los ratones maduros la hidroterapia, independientemente de la composición del agua empleada, reduce dichas conductas con respecto a los maduros no expuestos a ella. Así, los animales bañados mostraron una mayor deambulaci3n interna con respecto a la total en el “campo abierto” junto con una menor conducta de acicalamiento. Este efecto ansiol3tico de la hidroterapia *per se* confirma lo anteriormente observado en los ratones viejos as3 como viejos aislados de los subobjetivos 4.1. y 4.3. del presente trabajo. Adem3s, se corresponde a los hechos descritos en otros estudios de EA (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Pena *et al.*, 2006 ; Fox *et al.*, 2006; Leal-Galicia *et al.*, 2008; Arranz, 2009; Harati *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2015). Esto se suma a que se ha postulado que uno de los efectos de la terapia de baños con aguas atemperadas es la inducci3n de cierta relajaci3n (Bacaicoa San Martin, 2006) y, por tanto, todo ello atenuar3a la ansiedad. No obstante, cabe destacar que en los animales maduros la hidroterapia con agua rica en sulfuros parece potenciar en parte este efecto reductor de la ansiedad, de manera que estos animales mostraron menores conductas de defecaci3n y urinaria en relaci3n a los bañados en agua corriente, sin que este efecto sea tan claro como en el caso de las capacidades sensoriomotoras y la exploraci3n. Por su parte, en los ratones viejos, la hidroterapia *per se* tambi3n reduce algunas conductas de ansiedad, como las conductas de defecaci3n, con respecto a los animales viejos no enriquecidos, lo que de nuevo confirmaría lo anteriormente observado (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Bacaicoa San Martin, 2006; Pena *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2006; Leal-Galicia *et al.*, 2008; Arranz, 2009; Harati *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2015), pero sin llegar a ser esta mejora tan marcada como en el caso de los maduros. Adem3s, este efecto ansiol3tico no es tan generalizado como en el caso de la terapia de baños de 4 semanas de duraci3n, en animales tambi3n cronol3gicamente viejos, del subobjetivo 4.1. de la presente Tesis. Por tanto, en la vejez, la duraci3n del tratamiento de baños con agua corriente parece determinar sus efectos sobre los niveles de ansiedad del individuo. Adicionalmente, son los individuos viejos sometidos a la hidroterapia con aguas ricas en sulfuro los que experimentan una disminuci3n de sus respuestas de ansiedad m3s marcada en relaci3n no s3lo a los ratones viejos no expuestos a esta intervenci3n sino tambi3n a los ratones viejos bañados en agua

corriente. Por tanto, en el caso de la conducta de ansiedad, la acción indirecta de las aguas sulfuradas para fomentar las defensas antioxidantes en la vejez sí que es suficiente tras 2 semanas para generar dichos efectos beneficiosos.

En suma, la hidroterapia con aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuro supone una mejora de parámetros conductuales tales como las capacidades sensoriomotoras y la exploración así como una disminución de los niveles de ansiedad, que parece depender de forma importante de la edad de los individuos a los que se aplica así como del tiempo de duración de la estrategia, factores que se deberían tener en cuenta en futuros estudios para profundizar en los efectos de la misma en el envejecimiento. Estos efectos beneficiosos sobre la conducta, y por tanto, sobre el funcionamiento del sistema nervioso podrían ser consecuencia de la conjunción de la hidroterapia como un tipo de EA así como del efecto químico que inducen las aguas empleadas, dada su composición rica en sulfuros. En este sentido, algunos estudios han descrito que el sulfuro podría inducir cierto efecto antioxidante y neuroprotector sobre el sistema nervioso, y similar al producido por el glutatión (Kimura y Kimura, 2004; Whiteman *et al.*, 2005; Qu, 2008). Así mismo, la exposición a la hidroterapia con agua corriente durante un tiempo muy corto (2 semanas), mejora también algunos de los parámetros conductuales anteriormente mencionados tanto en los ratones maduros como viejos, si bien el efecto no parece tan marcado en la vejez como el observado en el subobjetivo 4.1. respecto al efecto sobre la conducta de los animales viejos de un protocolo de hidroterapia de 4 semanas de duración.

La base de una adecuada función de las células inmunitarias dependería del mantenimiento de un correcto equilibrio redox e inflamatorio en las mismas, según la Teoría de la oxidación-inflamación (De la Fuente y Miquel, 2009). Además, algunos estudios han descrito que el sulfuro de hidrógeno tendría ciertos efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y moduladores sobre la actividad de los leucocitos (Valiutti *et al.*, 1990; Mariggio *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Rinaldi *et al.*, 2006; Yang y Wang, 2007) así como se ha descrito que las aguas minerales ricas en sulfuro presentarían cierta capacidad antioxidante (Hernández Torres *et al.*, 2004). Por todo ello, tras el estudio conductual, se valoraron una serie de funciones en los leucocitos peritoneales de los ratones del estudio así como las concentraciones intracelulares de ROS (medidas en condiciones de estimulación) y de glutatión total (GT). Los resultados de las



**valoraciones inmunitarias** muestran que en los maduros y en los viejos, la hidroterapia induce un aumento de la **actividad citotóxica NK**, independientemente de la composición del agua empleada, con respecto a los animales de su misma edad estabulados en condiciones estándar. Por ello, la terapia de baños con agua sulfurada no induciría una mejora de este parámetro más allá de la que lleva a cabo la hidroterapia *per se*. Curiosamente, en los resultados del subobjetivo 4.1., la hidroterapia de 4-6 semanas de duración indujo un ligero aumento de la actividad NK en los leucocitos de los ratones viejos pero no significativo. Estos resultados indicarían que un menor tiempo de exposición a la estrategia podría ser más efectivo sobre este parámetro. Además, en el caso de los ratones viejos, se valoró la **capacidad fagocítica** de los macrófagos peritoneales. En este parámetro, la hidroterapia con agua corriente ya induce un aumento del mismo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, efecto que se potencia y alcanza significación estadística con el empleo de las aguas ricas en sulfuro. Por tanto, en este caso, el efecto beneficioso sobre la función de los macrófagos ya demostrado en el subobjetivo 4.1. de la presente Tesis, se aunaría al efecto antioxidante y antiinflamatorio de las aguas ricas en sulfuro (Valiutti *et al.*, 1990; Mariggio *et al.*, 1998; Hernández Torres *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Rinaldi *et al.*, 2006; Yang y Wang, 2007). Además, dicho efecto de las aguas mineralo-medicinales sería diferencial en función del tipo celular, al menos en los ratones viejos, siendo más efectivo en el caso de los macrófagos que, por otro lado, se han postulado como las células inmunitarias más sensibles a los efectos del envejecimiento (Vida *et al.*, 2017). En relación a los efectos de ambos tipos de hidroterapia sobre los **parámetros de estrés oxidativo** valorados, el baño tanto con agua corriente como rica en sulfuros no modificó las concentraciones intracelulares de **ROS**, en condiciones de estimulación, de los leucocitos de los ratones maduros y viejos, con respecto a los animales de su misma edad no sometidos a esta intervención. Por tanto, la estrategia, independientemente del agua empleada, no parece ejercer un efecto sobre este parámetro en las células inmunitarias. Esta ausencia de efecto en las concentraciones de ROS podría contradecir lo observado previamente en otro estudio, en el que una balneoterapia con aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuros indujeron un descenso de la concentración urinaria de TBARS (siglas inglesas de “Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico”) en pacientes de edad avanzada, demostrando la capacidad de estas aguas para atenuar el daño oxidativo a biomoléculas que se produce en el envejecimiento (Hernández Torres *et al.*, 2004). En lo que respecta a

las concentraciones de GT, en los ratones viejos se apreció un aumento por la exposición a la hidroterapia, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Por todo ello, sería necesario en futuras investigaciones relativas a la aplicación de hidroterapia con aguas sulfuradas realizar un estudio más amplio de sus efectos sobre la concentración o la actividad de oxidantes así como antioxidantes, para poder determinar con mayor firmeza sus efectos reductores sobre el estrés oxidativo de los leucocitos en la vejez.

En conclusión, la exposición durante un tiempo corto (2-4 semanas) a la hidroterapia tanto con agua corriente como con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros en ratones maduros y viejos induce una mejora en algunos parámetros conductuales e inmunitarios que se deterioran con la edad. Además, la hidroterapia con agua rica en sulfuros potencia alguno de los efectos de esta intervención de EA sobre los parámetros conductuales, en los ratones maduros y viejos, así como sobre algunos parámetros inmunitarios. Este efecto beneficioso sobre la inmunidad en los animales viejos podría radicar en que ambas estrategias producen cierto aumento de la concentración intracelular del antioxidante glutatión en las células inmunitarias, siendo ésta más patente en el caso de la aplicación de las aguas ricas en sulfuros. Aunque ninguna de las dos intervenciones, modificó las concentraciones de ROS en los leucocitos de los ratones maduros y viejos, es posible que la valoración de otros oxidantes y antioxidantes nos dieran mayor información sobre esos efectos. No obstante, este estudio supone una primera aproximación a la determinación de los efectos de la hidroterapia con aguas sulfuradas sobre la conducta así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos durante el envejecimiento, por lo que presenta ciertas limitaciones que deberían tenerse en cuenta en futuros estudios. Por ello, se propone ampliar el estudio inmunitario y de parámetros de estrés oxidativo con el fin de profundizar en los efectos de esta estrategia. Adicionalmente, dada la dependencia de la edad y la duración del tratamiento en los efectos observados, se debería tener en cuenta estos factores en los futuros diseños experimentales.

## **5.5. UTILIZACIÓN DE UNA SERIE DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA CONDUCTA DE RATONES CON ENVEJECIMIENTO CRONOLÓGICO, ASÍ COMO LA FUNCIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO DE SUS LEUCOCITOS.**

Además de las estrategias de EA, a cuyo estudio se ha dedicado el objetivo 4º de la presente Tesis, existen gran variedad de intervenciones de estilo de vida que han demostrado su capacidad para ralentizar e incluso revertir los efectos deletéreos del envejecimiento sobre el organismo, llegando incluso a alargar la vida del individuo, como pueden ser las intervenciones de tipo nutricional. No obstante, y aprovechando diversas colaboraciones con otros grupos de investigación así como con empresas (proyectos acogidos bajo el Art. 83), nos planteamos qué otras intervenciones, de distinta naturaleza a las más comúnmente estudiadas, podrían ejercer un posible efecto beneficioso sobre los sistemas reguladores en la vejez y, por tanto, sobre el estado de salud en estas últimas etapas de la vida. Buscando, además, que dichas intervenciones tuvieran una más que posible traslación al ser humano.

### **5.5.1. Efectos de la bebida de agua mineralo-medicinal sobre parámetros de función y estrés oxidativo de leucocitos en ratones maduros.**

Las aguas mineralo-medicinales que contienen azufre como componente principal ejercen una serie de efectos terapéuticos, que se conocen por las observaciones clínicas, e incluyen efectos antirreumáticos, antialérgicos, desintoxicantes, anti-inflamatorios o antipruriginosos (San Martín y Armiejo-Castro, 1994; Ghersetich y Lotti, 1996; Albertini et al., 2008). Así mismo, también se ha propuesto que este tipo de aguas mineralo-medicinales podría mejorar el estado redox, habiéndose observado una disminución de marcadores de oxidación en individuos sometidos a hidroterapia con aguas ricas en sulfuros, como ya se indicó anteriormente (Scheidleder et al., 2000; Ekmekcioglu et al., 2002; Leibetseder et al., 2004; Hernández-Torres et al., 2004; Benedetti et al., 2009). Los resultados obtenidos en el subobjetivo 4.4. de la presente Tesis indicaron que una administración tópica de un agua rica en sulfuros, mediante hidroterapia, puede inducir cierta mejora de una serie de parámetros conductuales en los ratones maduros si bien dichos efectos beneficiosos no se observaron en los parámetros inmunitarios y de estrés oxidativo evaluados en los leucocitos en estos animales. Por tanto, en el presente estudio nos propusimos conocer si la administración oral de dicha agua mineralo-

medicinal sulfurada durante 5 semanas sí pudiera ejercer cierto efecto sobre la inmunidad y el equilibrio redox de los leucocitos peritoneales de ratones maduros.

En cuanto a los resultados obtenidos en las **valoraciones inmunitarias**, se observa que la ingestión de agua rica en sulfuros ya indujo en la primera semana de tratamiento un aumento significativo de la **capacidad fagocítica** de los macrófagos peritoneales de los ratones maduros, con respecto a la de los animales de su misma edad que ingieren agua corriente. Por su parte, en el caso de la **actividad citotóxica NK**, no se observó un efecto de esta terapia hasta transcurridas 5 semanas, momento en el que se observó un aumento significativo de este parámetro en estos ratones maduros con respecto a los controles. Ambos resultados concuerdan con los obtenidos por otros estudios realizados en nuestro laboratorio, en los que la suplementación en la dieta con compuestos precursores de glutatión, en los que se incluyen los antioxidantes tiólicos como la NAC o la tioprolina (TP), supone una mejora de la fagocitosis de los macrófagos de ratones prematuramente envejecidos (PAM) (Puerto *et al.*, 2002; Guayerbas *et al.*, 2004) así como de los neutrófilos de mujeres postmenopáusicas (Arranz *et al.*, 2008) junto con un aumento de la actividad NK tanto en leucocitos de PAM (Guayerbas *et al.*, 2002c) como en mujeres postmenopáusicas (Arranz *et al.*, 2008). Además, estos resultados indicarían que sería necesario un mayor tiempo de exposición al agua enriquecida con sulfuros para poder observar un beneficio en la actividad NK mientras que ya en la primera semana mejora de forma notable la fagocitosis, por lo que los efectos de esta intervención sobre distintos parámetros de función inmunitaria podrían verse afectados por el tiempo de exposición a la misma.

Las aguas mineralo-medicinales ricas en sulfuro pueden ejercer un efecto antioxidante (Hernández Torres *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo muestran que la ingestión de aguas ricas en sulfuros aumentó la **producción intracelular de ROS**, en condiciones de estimulación con latex, tras 5 semanas de intervención. Esto no representa una contradicción, dado que las ROS producidas en presencia de estímulo son indicadoras de la capacidad digestiva que tienen las células fagocíticas. De hecho, incluso la presencia in vitro de antioxidantes tiólicos como el GSH, NAC y tioprolina aumentan las concentraciones de anión superóxido (Del Rio *et al.*, 1998), lo que indica que la capacidad de neutralizar los oxidantes no interfiere con un aumento de la maquinaria productora

de ROS necesarias para llevar a cabo una adecuada función digestiva. De hecho, se ha comprobado que el GSH es un oxidante que estimula el estallido respiratorio de los fagocitos (Atalay *et al.*, 1996). En lo que respecta a las **concentraciones de GT** en el interior de los leucocitos peritoneales de los ratones maduros éstas se encuentran ligeramente aumentadas tras ingerir agua rica en sulfuros, pero las diferencias no alcanzan significación estadística. Este hallazgo podría ser debido a que la cantidad de sulfuros contenida en esta agua pudiera no ser suficiente para inducir un aumento de la concentración de este antioxidante en los ratones maduros. De hecho, en este sentido, se ha descrito que los efectos beneficiosos de la ingesta de antioxidantes tiólicos (como la tioprolina y la NAC), que también se consideran precursores del glutatión, sobre parámetros de función inmunitaria, incluyéndose la fagocitosis y la actividad NK, dependerían de la cantidad ingerida de los mismos y de la edad de los individuos, de manera que ésta ha de ser mayor en el caso de los ratones viejos que en los adultos, en los que aún no se ha producido un aumento significativo del estrés oxidativo asociado a la edad (De la Fuente *et al.*, 2002; De la Fuente, 2015)

En suma, la ingesta de un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros durante 5 semanas induce mejora de algunos parámetros inmunitarios en los ratones maduros, y dicho efecto podría depender del tiempo de exposición a dicha estrategia. Así, los macrófagos ya experimentan un aumento notable de su capacidad fagocítica en la primera semana de tratamiento mientras que son necesarias 5 semanas para inducir una mejora de la actividad NK y de la concentración de ROS frente a un estímulo fagocítico. Es posible que las aguas mineralo-medicinales aquí empleadas, por su composición rica en sulfuros, puedan actuar como precursores del antioxidante glutatión, y aunque el mismo no aumenta de forma estadísticamente significativa, podría estar mediando los efectos positivos que a nivel funcional tiene, en las células inmunitarias de los ratones maduros, la ingestión de esas aguas. Esta es otra línea de investigación que merece la pena desarrollar en el futuro, determinando más parámetros de estrés oxidativo, así como de función y conducta en los animales de experimentación

### 5.5.2. Efectos de un tratamiento con Nutrisim® sobre la conducta de ratones viejos, así como sobre la función y el estrés oxidativo de los leucocitos de estos animales. Efectos sobre la longevidad.

El compuesto registrado como Nutrisim© (Biosim Laboratory, México) está constituido por una mezcla de aminoácidos (lisina, arginina, colina), sales y minerales (cloruro de calcio, magnesio y amonio) (Romero-Dávalos *et al.*, 2011), que podrían ejercer un efecto beneficioso en la conducta, la función y el estado redox de las células inmunitarias. Los estudios acerca de cómo podría este compuesto beneficiar a la salud son muy pocos, si bien en algunos de ellos se ha comprobado que induce un efecto positivo a nivel del sistema nervioso central así como en alguna patología en la que resulta implicado el sistema inmunitario (Romero-Dávalos *et al.*, 2011; Gonzalez-Renovato *et al.*, 2012; Gonzalez-Renovato *et al.*, 2013; Torres-Sanchez *et al.*, 2013; Bitzer *et al.*, 2013; Velázquez-Brizuela *et al.*, 2014). Por estas razones, nos propusimos conocer los efectos de un tratamiento durante 2 y 4 semanas con dicho compuesto sobre la conducta así como la función y el estrés oxidativo de los leucocitos peritoneales de ratones viejos.

Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo muestran que, en general, el tratamiento con Nutrisim© revierte el deterioro conductual e inmunológico y disminuye el estrés oxidativo característicos de la vejez, especialmente en el caso del tratamiento de 4 semanas de duración, alcanzando valores similares a los obtenidos en los ratones controles adultos en la mayoría de los parámetros estudiados.

En relación al **estudio conductual** realizado, Nutrisim© mejoró en los ratones viejos las **capacidades sensoriomotoras**, destacándose el equilibrio y la coordinación motora, y la **conducta exploratoria espontánea**, especialmente la de tipo vertical, y **dirigida** con respecto a los animales viejos no tratados, alcanzando en algunos casos los valores obtenidos en los controles de edad adulta. Así mismo, el tratamiento con este compuesto disminuyó los **niveles de ansiedad**, de manera que los animales viejos tratados manifestaron una menor conducta de acicalamiento así como de defecación y de micción con respecto a los controles no tratados. De hecho, esta mejoría observada en los parámetros evaluados es más notable tras un tratamiento de 4 semanas de duración. Por tanto, el presente estudio confirma que Nutrisim© puede ejercer un efecto positivo sobre el sistema nervioso en la vejez. Otros autores han demostrado con anterioridad que el

compuesto parece tener un cierto efecto neuroprotector ante fenómenos isquémicos a nivel cerebral (Romero-Dávalos *et al.*, 2011). Dado que se ha postulado que el compuesto objeto de estudio puede tener un efecto antioxidante y antiinflamatorio (Romero-Dávalos *et al.*, 2011; Torres-Sánchez *et al.*, 2013; Velázquez-Brizuela *et al.*, 2014), y como tanto la isquemia como el envejecimiento tienen como base un aumento del estrés oxidativo e inflamatorio (Chen *et al.*, 2011; De la Fuente y Miquel, 2009), podría ser esa capacidad la subyacente a la mejora de la capacidad funcional del sistema nervioso, y del estado de salud en general, observado en los ratones viejos tratados. Por otro lado, alguno de los componentes de Nutrisim® también podrían ejercer por sí mismos un efecto beneficioso sobre el sistema nervioso. Tal es el caso de la colina. Así, se ha demostrado que un aumento (como suplemento en la dieta) o un déficit de los niveles de este compuesto modificarían varios parámetros conductuales en animales de experimentación (Fundaró y Paschero, 1991). Por ejemplo, un déficit de colina conllevaría un deterioro de las capacidades sensoriomotoras, entre otros parámetros conductuales (Pacelli *et al.*, 2010). Por tanto, la administración continuada de Nutrisim® podría mejorar la función del sistema nervioso en la vejez, tanto por el conjunto de sus componentes o por la acción concreta de alguno de ellos. Además, este efecto beneficioso parece dependiente del tiempo de administración del compuesto. De hecho, es el tratamiento de 4 semanas de duración el que parece ejercer un efecto más notable y global en los parámetros analizados, asemejándose sus valores a los obtenidos en los ratones de edad adulta.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el **estudio inmunitario** en los leucocitos peritoneales, se observa que el compuesto, especialmente tras 4 semanas de administración, revierte el deterioro de las **funciones de macrófagos** analizadas, como son la **quimiotaxis** y la **fagocitosis**, así como el mostrado por la **actividad citotóxica NK** que tiene lugar en los individuos viejos. Mientras que es el tratamiento de 2 semanas de duración el que parece actuar de forma positiva sobre la inmunidad adquirida, concretamente sobre la **funcionalidad** de los **linfocitos** peritoneales. De hecho, lo hace de manera más destacable sobre la **proliferación** linfocitaria. Este estudio es el primero que demuestra que Nutrisim® ejerce efectos sobre las células inmunitarias, por lo que carecemos de referencias bibliográficas directas que apoyen los resultados obtenidos en el presente subobjetivo. No obstante, los efectos beneficiosos del Nutrisim® sobre la inmunidad podrían radicar en factores indirectos o

directos. Dentro de las acciones indirectas, se destacaría la comunicación entre los sistemas reguladores. En este sentido, otras estrategias que parecen actuar de forma predominante sobre el sistema nervioso, como es el caso del EA, tratado largamente en el objetivo 4 de la presente Tesis, también mejorarían la función inmunitaria, incluso en individuos envejecidos (Arranz *et al.*, 2010c; De la Fuente *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los efectos positivos del compuesto sobre el sistema nervioso ya comentados anteriormente y en base a la bidireccionalidad de la comunicación neuroinmunoendocrina, éstos se reflejarían en las capacidades funcionales del sistema inmunológico. Además, el deterioro inmunitario asociado con el envejecimiento tiene una base oxidativa e inflamatoria (De la Fuente y Miquel, 2009). Dados los efectos beneficiosos sobre el estado de oxidación e inflamación celular que parece tener el compuesto (Romero-Dávalos *et al.*, 2011; Gonzalez-Renovato *et al.*, 2012; Velázquez-Brizuela *et al.*, 2014), éstos podrían actuar sobre las células inmunitarias mejorando su funcionalidad, de manera similar a lo ocurrido en otras estrategias en el envejecimiento (De la Fuente *et al.*, 2011). Además, algunos de los componentes de Nutrisim© también podrían actuar de forma positiva sobre la función del sistema inmunitario. Así, numerosos estudios han demostrado que la arginina, entre otras acciones beneficiosas, ejerce un efecto positivo sobre la funcionalidad del sistema inmunitario (Efron y Barbul, 1998; Tong y Barbul, 2004).

Por otro lado, las **concentraciones de citoquinas** secretadas por los leucocitos peritoneales en cultivo en presencia de ConA y LPS están relacionadas con la capacidad funcional de dichas células y del sistema inmunitario en general, dado que mimetizarían la capacidad de respuesta de las células inmunitarias ante una posible infección. Los resultados obtenidos en el presente subobjetivo muestran que el tratamiento de 2 semanas de duración con Nutrisim® induce, en general, un aumento de las citoquinas proinflamatorias con respecto a los controles viejos como es el caso de la IL-1 $\beta$  o la IL-6 (preferentemente bajo estimulación con ConA), similar a lo observado en los ratones adultos. Se ha comprobado, incluyéndose los resultados obtenidos en el estudio longitudinal del subobjetivo 1.2. de la presente Tesis, que los leucocitos peritoneales de ratones viejos no son capaces de responder a los mitógenos, que mimetizan a una infección *in vitro*, secretando adecuados niveles de citoquinas proinflamatorias, hecho que sí hacen las células inmunitarias de animales adultos (Arranz *et al.*, 2010b). No obstante, los efectos del tratamiento sobre los niveles de la



citoquina anti-inflamatoria IL-10 no son tan claros, observándose un ligero aumento no significativo en presencia de ConA, pero una disminución en presencia de LPS. Si bien éstos resultados en relación a la IL-10 podrían indicar cierto déficit en el control de la respuesta inflamatoria frente a un proceso infeccioso y, por tanto, contradecir a otros estudios publicados (Bitzer *et al.*, 2013), los ratones tratados con Nutrisim® podrían realizar dicho control mediante otras vías. Sin embargo, no contamos con suficientes datos para poder corroborar o desechar esta posibilidad. Por otro lado, el tratamiento de 2 semanas induce un aumento muy significativo de las citoquinas reguladoras (IL-2 e IL-17), con valores incluso superiores a los observados en los controles de edad adulta. Por todo ello, los resultados obtenidos indicarían una mejor funcionalidad de las células inmunitarias tras el tratamiento, ya que el compuesto mejoraría la capacidad de los leucocitos para secretar citoquinas que contribuyan a luchar frente a antígenos, revirtiendo el deterioro de esta función de secreción asociado con el envejecimiento.

En cuanto a los **parámetros** estudiados para valorar el **estado de oxidación** de las células inmunitarias, Nutrisim® produjo una disminución, de forma destacable, de los niveles de compuestos oxidantes, y un aumento, si bien no tan significativo, de las defensas antioxidantes, especialmente tras 4 semanas de tratamiento. Estos resultados se corresponderían con los observados por otros autores (Torres-Sánchez *et al.*, 2013). De hecho, el cociente GSSG/GSH, un indicador del estado de estrés oxidativo (Viña, 1990; Jones, 2002CITA), está significativamente disminuido en los leucocitos de los animales tratados. Además, teniendo en cuenta que la correcta funcionalidad del sistema inmunitario radica en el mantenimiento de unos niveles adecuados y controlados de oxidación (De la Fuente y Miquel, 2009), los efectos beneficiosos del compuesto sobre las células inmunitarias de animales viejos podrían deberse fundamentalmente a su acción beneficiosa sobre el estrés oxidativo e inflamatorio, característico de la vejez.

A pesar de que muchas de las funciones aquí valoradas se podrían considerar buenos marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016) y de que el tratamiento con Nutrisim® induce una mejora en la mayoría de ellos, estadísticamente éste no parece alargar la **longevidad media** de los ratones viejos tratados con respecto a los no tratados. No obstante, cabe destacar que un 10% de los animales del grupo de tratamiento

alcanzó una edad longeva. Por tanto, el hecho de que una estrategia mejore la funcionalidad de los sistemas nervioso e inmunitario en la vejez sin reflejarse en la longevidad media de los individuos ya ha sido observado previamente. Tal es el caso del EA con juguetes que, como se ha visto en anteriores estudios (Arranz *et al.*, 2010c) así como en el subobjetivo 4.1. de esta Tesis, induce una notable mejoría del funcionamiento de los sistemas reguladores en animales viejos sin poder alargar su vida media. Ésta puede ser una de las posibles causas de por qué el Nutrisim© no alargue la vida de los ratones, el hecho de que el tratamiento se inicia en la vejez, en un momento en el que el proceso de envejecimiento está bien establecido. Pero otras causas como el tiempo de duración del tratamiento o la dosis empleada así como incluso el número de individuos utilizados podrían estar influyendo. Todo ello debería tenerse en cuenta a la hora de abordar futuros estudios para profundizar sobre el efecto de dicho compuesto sobre los sistemas reguladores y la longevidad de los individuos tratados con el mismo. No obstante, hay que tener presente la relevancia de que una intervención mejore parámetros de salud, aunque no repercuta en la longevidad, pues lo importante es mejorar la calidad del tiempo de vida más que alargar simplemente el mismo.

En conclusión, un tratamiento con Nutrisim© de 2 y 4 semanas de duración parece revertir el deterioro conductual e inmunitario característico de la vejez, siendo este efecto más patente en el tratamiento de 4 semanas de duración. Dicha mejoría podría deberse a la acción beneficiosa del compuesto sobre el estado redox del organismo (induciendo un aumento de las defensas antioxidantes y, especialmente, un descenso de los compuestos oxidantes). Por tanto, la aplicación de este compuesto se postularía como una buena intervención para revertir el deterioro de los sistemas reguladores en la vejez y, por tanto, para mantener un buen estado de salud en las últimas etapas de la vida.

### **5.5.3. Efectos de un tratamiento crónico con atenolol sobre la función de leucocitos en ratones viejos machos.**

En la búsqueda de nuevas estrategias para enlentecer el proceso de envejecimiento y alcanzar una longevidad saludable, en el presente subobjetivo nos planteamos si un tratamiento crónico con el fármaco atenolol pudiera actuar de forma positiva sobre el funcionamiento de las células inmunitarias de ratones machos viejos. El atenolol es un bloqueante del receptor adrenérgico  $\beta_1$  que se ha utilizado frecuentemente en humanos durante las últimas décadas para tratar

diversas patologías cardiovasculares. Se considera un fármaco seguro para la salud al no mostrar efectos secundarios significativos. Por otra parte, estudios previos han descrito que un tratamiento de corta duración con atenolol, dado en el agua de bebida, disminuye el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana en roedores (Sanchez-Roman *et al.*, 2010; Sánchez-Roman *et al.*, 2014). Así mismo, un tratamiento crónico con este fármaco también demostró en ratones viejos su eficacia para disminuir el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana y la cantidad de grasa visceral, así como indujo una disminución de algunos marcadores de estrés oxidativo (Gómez *et al.*, 2014). En este contexto hay que considerar que tanto la tasa de producción de ROS mitocondriales como la composición de ácidos grasos insaturados de las membranas son dos parámetros que se relacionan con la longevidad. De hecho, animales (pájaros y mamíferos) longevos manifiestan una baja tasa de producción de ROS mitocondrial (Barja, 2013) y un bajo grado de insaturación en sus ácidos grasos de membrana, un parámetro que se ha relacionado con la longevidad (Pamplona *et al.*, 2002; Hulbert *et al.*, 2007; Naudi *et al.*, 2011). Además, los efectos del atenolol sobre los sistemas nervioso e inmunitario han sido poco estudiados, no obstante el trabajo de Gómez *et al.* (2014), en el que participó nuestro grupo, demostró que el tratamiento crónico con este fármaco puede mejorar algunos parámetros conductuales y de función inmunitaria en los leucocitos esplénicos, si bien no modificó la longevidad de los animales.

Los resultados obtenidos de las **valoraciones inmunitarias** realizadas en el presente subobjetivo demuestran que el tratamiento crónico con el atenolol (desde los 2 meses de edad) revierte el deterioro funcional de los leucocitos peritoneales asociado con el envejecimiento. Así, los **macrófagos** de los animales tratados con este fármaco presentaron una mayor **quimiotaxis** y **fagocitosis** con respecto a los controles viejos, alcanzando valores similares a los mostrados por los individuos de edad adulta. Esta mejor funcionalidad de los macrófagos inducida por el atenolol se corresponde con lo obtenido en un estudio previo en el que macrófagos alveolares tratados con dicho compuesto aumentan la liberación *in vitro* de las citoquinas proinflamatorias IL6 y TNF $\alpha$  en respuesta al LPS (Guo *et al.*, 2011), lo que podría indicar una mejor respuesta de estas células inmunitarias ante un proceso infeccioso (mimetizado en este caso por el LPS). De forma similar, en cuanto a las **funciones de linfocitos**, cabe destacar que el tratamiento con atenolol indujo en estas células un aumento de su capacidad de movilidad hacia el foco de infección o

**quimiotaxis** junto con una mayor **respuesta proliferativa a los mitógenos LPS** (en este caso, no significativa) **y ConA** en relación a los ratones viejos no tratados y acercándose o incluso igualándose a los valores obtenidos en los controles adultos. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por el estudio de Gómez *et al.* (2014), en el que el tratamiento crónico con atenolol no modificó la capacidad de proliferación de los leucocitos esplénicos a los mitógenos LPS y ConA en los ratones viejos. No obstante, en dicho trabajo, el compuesto sí indujo un aumento de la quimiotaxis de las células inmunitarias procedentes de bazo, lo que sí concurre con los resultados relativos a este parámetro obtenidos en el presente subobjetivo. Hay que tener en cuenta que en el diseño experimental para valorar la proliferación se dan diferencias en la obtención de los leucocitos esplénicos o peritoneales, y esto puede influir en los resultados. Los efectos del bloqueo de los receptores  $\beta 1$  adrenérgicos en las células inmunitarias, que produciría en este caso el atenolol, está muy poco estudiado. Esto es de debido a que el receptor adrenérgico que expresan de forma predominante los leucocitos es el tipo  $\beta 2$ , cuya activación modula toda una serie de funciones en dichas células (Madden, 2003; Fan y Wang, 2009). No obstante, Emeny *et al.*, (2007) describieron que la inhibición de la respuesta de defensa de los linfocitos ante una infección por *Listeria monocytogenes* tras un estrés podría estar mediada por los receptores adrenérgicos  $\beta 1$  y que una pérdida de la vía de señalización de dicho receptor mejoraría, de forma general, dicha respuesta y la inmunidad celular. Dado, que el atenolol bloquea este subtipo de receptor adrenérgico, la mejoría observada en la respuesta de los linfocitos peritoneales a los mitógenos aquí empleados (que mimetizaría *in vitro* la respuesta ante los antígenos que se produce *in vivo*) podría concordar con los resultados del trabajo anteriormente comentado. Por su parte, al igual que lo observado previamente en el estudio de Gómez *et al.* (2014) en leucocitos esplénicos, el tratamiento con atenolol revierte el deterioro asociado con la edad de la **actividad citotóxica NK**, ya que los ratones viejos tratados manifiestan valores mayores de dicho parámetro con respecto a los ratones viejos no tratados, siendo similares a los obtenidos en los individuos de edad adulta.

Como se ha comentado anteriormente, el efecto de los receptores  $\beta 1$  adrenérgicos está muy poco estudiado y, consecuentemente, el de su bloqueo. Esto hace difícil dar una explicación directa de por qué el atenolol, un compuesto  $\beta 1$ -bloqueante, induce la mejoría en el funcionamiento de los leucocitos obtenido en el presente subobjetivo,

además de en estudios anteriores (Guo *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2014). No obstante, dado que se ha descrito que el tratamiento crónico con atenolol en los ratones viejos reduce el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, la cantidad de grasa visceral así como algunos marcadores de estrés oxidativo, disminuyendo el daño oxidativo a biomoléculas en algunos órganos (Gómez *et al.*, 2014), procesos que se producen al envejecer, estos podrían ser algunos de los mecanismos implicados en los efectos encontrados en el presente sub-objetivo. Así, los efectos beneficiosos del tratamiento crónico con atenolol podrían deberse a su efectividad para reducir el estrés oxidativo que se produce en las células inmunitarias al envejecer, el cual se acompaña del establecimiento de un estrés inflamatorio, mermando su capacidad funcional (De la Fuente y Miquel, 2009). De igual manera, dada la relación existente entre la oxidación y la inflamación (Kulinsky, 2007; Vida *et al.*, 2014), dicho fármaco también podría ejercer cierto efecto antiinflamatorio que subyaciera a la mejora funcional observada en los leucocitos peritoneales de los ratones viejos del presente estudio. Por otra parte, las membranas de las células inmunitarias tienen un alto grado de insaturación en sus ácidos grasos, lo que las hace muy susceptibles al daño oxidativo, máxime en estas células muy expuestas a la generación de ROS (Vida *et al.*, 2014). La acción del atenolol disminuyendo la insaturación de los ácidos grasos también es un posible mecanismo a tener en cuenta de cara a entender sus efectos positivos en la función inmunitaria. Por ello, todos esos posibles mecanismos deberían tenerse en cuenta en futuras investigaciones, en las que se podrían determinar una serie de parámetros de oxidación (tanto oxidantes como antioxidantes), de inflamación (como las concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por parte de los leucocitos) y características de los ácidos grasos de membrana en las células inmunitarias de individuos viejos tratados con el compuesto.

En conclusión, el tratamiento crónico con atenolol (desde los 2 meses de edad) induce en la vejez una notable mejoría de una serie de parámetros de función en los leucocitos peritoneales, siendo una posible intervención para paliar el deterioro inmunitario asociado con la edad. Dicha mejora de la inmunidad aseguraría una adecuada defensa frente a infecciones a patógenos, que suponen uno de los factores de riesgo de enfermedad y mortalidad más importantes en la vejez (Ginaldi *et al.*, 1999; Lord *et al.*, 2001; Fulop *et al.*, 2004; De la Fuente *et al.*, 2004b; 2005; 2008) y, consecuentemente, un buen estado de salud en las últimas etapas de la vida.

### **5.5.4. Efectos de una terapia de nanopulsos con Pulsarión® sobre la función de leucocitos en ratones viejos.**

Los efectos en organismos vivos de la exposición a varias formas de energía electromagnética, han sido objeto de interés y también de debate durante muchas décadas (Sutbeyaz *et al.*, 2009; Sollazzo *et al.*, 2010). Con respecto al sistema inmunitario, existen varios estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos sobre la función inmunitaria (Mooney *et al.*, 1986; Simko y Mattson, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2006; Gomez-Ochoa *et al.*, 2010). Por su parte, un tratamiento con microondas indujo una mejora notable de varias funciones de leucocitos, incluyendo la adherencia, la fagocitosis de los macrófagos, los niveles de anión superóxido, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la respuesta de proliferación de los linfocitos en presencia del mitógeno PHA (Zafra, 1985; Zafra *et al.*, 1998).

En la actualidad, las investigaciones en el campo de los efectos de la energía electromagnética sobre el organismo parecen estar más enfocadas a los nanopulsos. Un nanopulso electromagnético tiene un periodo de duración de 1 a 10 ns y se describe como un pulso de banda ultra-ancha. Este tipo de radiación se usa en varios tratamientos médicos (Beebe *et al.*, 2003; Schoenbach *et al.*, 2004; Beebe *et al.*, 2004; Tekle *et al.*, 2005; Nuccitelli *et al.*, 2006; Bojjawar *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2008). Pero sus verdaderos efectos biológicos se conocen relativamente poco (Lu y de Lorge, 2008), por lo que se ha propuesto que dichos efectos deberían analizarse para conocer si carecen de efectos secundarios no deseados para la salud y asegurar su uso adecuado en terapias (Su *et al.*, 2009). En lo que respecta a los efectos de los nanopulsos sobre la conducta de animales de experimentación y en la función inmunitaria, especialmente en la vejez, son aspectos que todavía no han sido investigados. Por lo tanto, en el presente subobjetivo nos propusimos estudiar los efectos de una terapia de nanopulsos (con el aparato Pulsarión®) de corta duración sobre una serie de parámetros conductuales y de función de las células inmunitarias peritoneales en ratones viejos.

En la respuesta conductual el tratamiento no parece muy efectivo, al menos en las características del diseño utilizado. Puede ser destacable el aumento de la exploración vertical, pero otros resultados son de difícil explicación, y no hay referencias al respecto que nos permitan interpretar adecuadamente lo observado. En lo que respecta a las funciones leucocitarias estudiadas, las mismas han sido propuestas como marcadores de edad biológica y predictores de

longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016). Los **macrófagos**, los cuales sufren un deterioro de su capacidad para fagocitar y digerir material extraño con el envejecimiento (De la Fuente, 1985; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Arranz *et al.*, 2010a; Sharma *et al.*, 2014; Martínez De Toda *et al.*, 2016), son estimulados con la terapia de nanopulsos. Así, los resultados mostraron como dicha intervención en los ratones viejos revirtió el declive de la **capacidad fagocítica** que sucede al envejecer, de manera que los macrófagos peritoneales de los ratones tratados presentaron mayores niveles de fagocitosis con respecto a los animales viejos no tratados, alcanzando valores similares a los obtenidos en los individuos de edad adulta. En relación a la **función linfocitaria**, los resultados obtenidos en la **respuesta proliferativa** de los linfocitos peritoneales en el presente subobjetivo indican que la terapia de nanopulsos aumenta de forma significativa la capacidad de proliferación de estas células en presencia de los mitógenos **LPS y ConA** en los ratones viejos con respecto a los individuos de igual controles, acercándose o incluso asemejándose los valores a los observados en los animales de edad adulta. Al ser esta función una de las que más se deteriora al envejecer (Medina *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2004a; 2008a; Simioni *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2010a; Martínez De Toda *et al.*, 2016), el tratamiento parece poder “rejuvenecerla” de forma importante. También la menor **actividad citotóxica NK** que acompaña al envejecimiento (Ferrández *et al.*, 1999; De la Fuente *et al.*, 2002; 2004a; Puerto *et al.*, 2005; Martínez De Toda *et al.*, 2016) es revertida gracias a la terapia de nanopulsos, de modo que los valores de este parámetro en los ratones viejos tratados se iguala a la presentada en los animales adultos.

En suma, un tratamiento de corta duración con nanopulsos revierte el deterioro inmunitario que se produce al envejecer. Como se ha indicado, al ser las funciones inmunitarias determinadas en este estudio marcadores de edad biológica y predictores de longevidad (Martínez De Toda *et al.*, 2016), la notable mejora que induce esta terapia sobre las mismas indicaría su potencialidad como una estrategia válida para enlentecer el envejecimiento y, quizás, alargar la esperanza de vida. No obstante, no se conocen los mecanismos que subyacen a dicha mejoría. El presente diseño experimental supone una primera aproximación al estudio de los efectos de los nanopulsos sobre la inmunidad en la vejez y es mucho lo que queda por investigar a este respecto. Conocer si dicha terapia modula el estrés oxidativo e inflamatorio crónico que se establece al avanzar la edad y que pudiera subyacer a la mejora funcional observada en los ratones viejos tratados

## Discusión

---

en este estudio, además de analizar si esta terapia de nanopulsos realmente es eficaz para alargar la longevidad son objetivos dignos de tener en cuenta para desarrollar en el futuro.





# **Conclusiones**



A continuación se indican las conclusiones que pueden extraerse de la presente Tesis.

En relación al **primer objetivo**, *“Profundización y nuevas aproximaciones en el estudio de la inmunosenescencia en el envejecimiento cronológico en ratones”*, puede concluirse que:

1. Con la edad no se modifica la elasticidad de los linfocitos T peritoneales ni existe relación entre el valor de la misma en la edad adulta-madura y la longevidad del individuo.
2. Con el envejecimiento los leucocitos en estado de reposo aumentan la secreción de algunas citoquinas pro-inflamatorias y disminuyen la de la anti-inflamatoria IL10. Por su parte, las concentraciones intracelulares de estas citoquinas aumentan al envejecer. En condiciones de estimulación con mitógenos, los leucocitos secretan y contienen menores concentraciones de citoquinas, tanto pro como anti-inflamatorias, conforme avanza la edad. Todo ello confirma que al envejecer las células inmunitarias participan en una inflamación estéril y presentan peor capacidad para realizar una respuesta inmunitaria adecuada.

Con respecto al **segundo objetivo**, *“Profundización en parámetros conductuales e inmunitarios en ratones envejecidos prematuramente (PAM)”*, las conclusiones que se extraen son las siguientes:

3. Los PAM en la edad adulta muestran mayores actividad física voluntaria y conducta de enterramiento así como un deterioro de la conducta de anidación con respecto a los NPAM. Esto corrobora la hiperreactividad al estrés y mayor ansiedad de los PAM, lo que confirma su envejecimiento prematuro.
4. Los PAM adultos, al igual que los ratones cronológicamente viejos, tienen unos leucocitos que secretan, en estado basal, mayores cantidades de citoquinas proinflamatorias y menores de antiinflamatorias, mientras que en condiciones de estimulación con mitógenos la liberación de las citoquinas es menor que en los NPAM. Todo ello sigue confirmando la validez de los PAM como un modelo de envejecimiento prematuro.

En lo referente al **tercer objetivo**, *“Estudio de los efectos del aislamiento social y de la ansiedad en modelos murinos a diferentes edades”*, se puede concluir que:

5. La separación materna, en ratas, supone para las crías un deterioro del sistema inmunitario que se mantiene en la edad adulta. Por tanto, padecer estrés psicológico en las primeras etapas de la vida mermaría la capacidad del individuo adulto para defenderse frente a infecciones.
6. El aislamiento social así como los elevados niveles de ansiedad en la vejez, tanto en ratas como en ratones, acentúan el deterioro inmunitario asociado a la edad, acortando la vida de los individuos que lo padecen, al menos en el caso de los ratones. Además, responder con altos niveles de ansiedad al aislamiento intensifica dicha inmunosupresión y el estrés oxidativo e inflamatorio que subyace al deterioro funcional inmunitario. Por tanto, el aislamiento social, un estado de ansiedad y, particularmente, responder con ansiedad a dicho estrés psicológico, suponen un envejecimiento acelerado, aumentando el riesgo de morbilidad y mortalidad en los individuos que lo padecen.
7. En los ratones adultos, el aislamiento social, particularmente en los ratones más ansiosos, produce un deterioro conductual e inmunitario así como un descenso de algunas defensas antioxidantes en los leucocitos peritoneales, parecido al observado en el envejecimiento cronológico y prematuro, sin modificar la esperanza de vida de los individuos. Similares resultados se obtienen en los animales que tienen altos niveles de ansiedad sin enfrentarse al estrés psicológico del aislamiento.

En cuanto al **cuarto objetivo**, *“Estrategias de enriquecimiento ambiental para mejorar parámetros conductuales y de función y estrés oxidativo en leucocitos de ratones con envejecimiento cronológico, prematuro y acelerado. Efectos sobre la longevidad”*, las conclusiones extraídas son:

8. La exposición de ratones cronológicamente viejos y de adultos prematuramente envejecidos (PAM) a un ambiente enriquecido con juguetes, incluso durante periodos cortos de tiempo, produce una notable mejora conductual así como de

función y de estrés oxidativo en los leucocitos peritoneales, llegando a revertir en algunos casos el deterioro que experimentan debido al envejecimiento. Además, los PAM expuestos a un ambiente enriquecido también viven significativamente más con respecto a los PAM no enriquecidos. Por tanto, se corrobora que el EA con juguetes es una potente estrategia para reducir la edad biológica del individuo y para alargar su esperanza de vida siempre y cuando la exposición a dicho ambiente enriquecido se inicie en etapas tempranas de la vida.

9. La terapia de baños durante un periodo corto en la vejez puede ser considerada como una nueva estrategia de EA que no sólo mejora la calidad de vida de los individuos de edad avanzada sino también alarga su longevidad media. Así mismo, la hidroterapia resulta una estrategia eficaz para frenar aspectos de la inmunosenescencia acelerada que sufren los ratones viejos sometidos a aislamiento social, aumentando la esperanza de vida de dichos individuos.
10. La hidroterapia con agua mineralo-medicinal rica en sulfuros, incluso durante un periodo muy corto, potencia algunos de los efectos beneficiosos de la hidroterapia con agua corriente, en lo referente a diversos parámetros conductuales e inmunitarios en los ratones maduros y viejos.

Por último, en relación al **quinto objetivo**, *“Utilización de una serie de estrategias para mejorar parámetros conductuales así como de función y estrés oxidativo de leucocitos de ratones con envejecimiento cronológico”*, se puede concluir que:

11. La ingesta de un agua mineralo-medicinal rica en sulfuros induce una mejora de algunos parámetros de la inmunidad innata en los ratones maduros, dependiendo dicho efecto del tiempo de ingestión.
12. El tratamiento con Nutrisim® revierte el deterioro conductual e inmunitario característico de la vejez, siendo este efecto más patente en el tratamiento de 4 semanas de duración. Dicha mejoría podría deberse al mejor estado redox que genera el tratamiento.

- 13. Un tratamiento crónico con atenolol mejora notablemente el funcionamiento del sistema inmunitario en la vejez.**
- 14. Un tratamiento de corta duración en ratones con nanopulsos revierte el deterioro inmunitario que se produce al envejecer en los leucocitos peritoneales.**
- 15. Todas estas estrategias al mejorar la inmunidad posibilitan un proceso de envejecimiento más lento y un mejor estado de salud en las últimas etapas de la vida.**

# Referencias





- Ackerman KD, Felten SY, Bellinger DL, Felten DL. **Noradrenergic sympathetic innervation of splenn III: development of innervation in rat spleen.** J Neurosci Res 1987, 18: 49-54.
- Ackerman SH, Keller SE, Schleifer SJ, Shindledecker RD, Camerino M, Hofer MA, Weiner H, Stein M. **Premature maternal separation and lymphocyte function.** Brain Behav Immun 1988, 2: 161-5.
- Adam EK, Hawkley LC, Kudielka BM, Cacioppo JT. **Day-to-day dynamics of experience-cortisol associations in a population-based sample of older adults.** Proc Nat Acad Sci U S A 2006, 103: 17058-63.
- Ader R, Cohen N. **Behaviorally conditioned immunosuppression.** Psychosom Med 1975, 37: 333.
- Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. **The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span.** Neurobiol Aging 2005, 26: 511-20.
- Adolfsson O, Huber BT, Meydani SN. **Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naïve but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity.** J Immunol 2001, 167: 3809-17.
- Aguilera G. **HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging.** Exp Gerontol 2011, 46: 90-5.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramirez MJ. **Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats.** Psychoneuroendocrinology 2007, 32: 256-66.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramirez MJ. **Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats.** Neuroscience 2008, 154: 1218-26.
- Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D. **Age dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans.** Mech Ageing Dev 2006, 127: 560-6.
- Albertini MC, Teodori L, Accorsi A, Soukri A, Campanella L, Baldoni F, Dachà M. **Sulphurous mineral water oral therapy: effects on erythrocyte metabolism.** Food Chem Toxicol 2008, 46: 3343-50.
- Albright JW, Bream JH, Bere EW, Young HA, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. **Aging of innate immunity: functional comparisons ok NK/LAK cells obtained from bulk cultures of young and aged mouse spleen cells in high concentrations of interleukin-2.** Exp Gerontol 2004, 39: 73-82.
- Allamn D, Miller JP. **B cell development and receptor diversity during aging.** Curr Opin Immunol 2005, 17: 463-7.

- Almeida FF, Belz GT. **Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection.** *Mucosal Immunol* 2016, 9: 1103-12.
- Alonso-Fernández P, Puerto M, Mate I, Ribera JM, De la Fuente M. **Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults.** *J Am Geriatr Soc* 2008, 56: 2244-51.
- Alonso-Fernández P. **Estudio del perfil inmunológico en individuos centenarios.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2006.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. **Improvement of leukocytes functions in young prematurely aging mice after 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants.** *Antioxid Redox Signal* 2005, 7: 1203-9.
- Alvarado C, Álvarez P, Jiménez L, De la Fuente M. **Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants.** *Dev Comp Immunol* 2006b, 30: 1168-80.
- Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez L, De la Fuente M. **Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice.** *Nutrition* 2006a, 22: 767-77.
- Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M. **Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals.** *Nutrition* 2006, 22: 913-21.
- Álvarez-Rodríguez L, López Hoyos M, Muñoz-Cabo P, Martínez-Taboada VM. **Aging is associated with circulating cytokine dysregulation.** *Cell Immunol* 2012, 273: 124-32.
- Amberg D, Leadsham JE, Kotiadis V, Gourlay CW. **Cellular ageing and the actin cytoskeleton.** *Subcell Biochem* 2012, 57: 331-52.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 7915-22.
- Annunziato F, Romagnani S. **Heterogeneity of human effector CD4+ T cells.** *Arthritis Res Ther* 2009, 11: 257.
- Anstead MI, Hunt TA, Carlson SL, Burki NK. **Variability of peripheral blood lymphocyte beta-2-adrenergic receptor density in humans.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157: 990-2.
- Aranda R, Doménech E, Rus AD, Real JT, Sastre J, Viña J, Pallardó FV. **Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues.** *Free Radic Res* 2007, 41: 1995-2000.

- Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, van't Klooster J, Ohl F. **Individual housing of mice impact on behaviour and stress responses.** *Physiol Behav* 2009, 97: 385-93.
- Arranz L, Caamaño JH, Lord JM, De la Fuente M. **Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: possible role of nuclear factor-kappa  $\beta$ .** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010a, 65: 941-50.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. **Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice.** *Biogerontology* 2010c, 11: 475-82.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Giménez-Llort L, De la Fuente M. **Effect of environmental enrichment on the immunoendocrine aging of male and female triple-transgenic 3xTg-AD mice for Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis* 2011, 25: 727-37.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Mate I, Viveron MP, De la Fuente M. **Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice.** *Rejuvenation Res* 2010c, 13: 415-28.
- Arranz L, De Vicente A, Muñoz M, De la Fuente M. **Impairment of immune function in the social excluded homeless population.** *Neuroimmunomodulation* 2009a, 16: 251-60.
- Arranz L, Fernández G, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M. **The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women.** *Free Rad Biol Med* 2008, 45: 1252-62.
- Arranz L, Gimenez-Llort L, De Castro NM, Baeza I, De la Fuente M. **Social isolation during old age worsens cognitive, behavioural and immune impairment.** *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009b, 44: 137-42.
- Arranz L, Guayerbas N, De la Fuente M. **Impairment of several immune functions in anxious women.** *J Psychosom Res* 2007, 62: 1-8.
- Arranz L, Lord JM, De la Fuente M. **Preserved ex vivo inflammatory status and cytokine responses in naturally long-lived mice.** *Age* 2010b, 32: 451-66.
- Arranz L. **Mecanismos de inmunosenescencia y longevidad. Posibles estrategias para mejorar la calidad de vida en el envejecimiento.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2009.
- Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez EO, Garcés-Alvarez ME, D la Cruz-Aguilera DL, Medina-Rivero E, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabián S, Pavón L. **Immunomodulatory effects mediated by dopamine.** *J Immunol Res* 2016, 2016: 3160486.

- Aspinall R, Pitts D, Lapenna A, Mitchell W. **Immunity in the elderly: the role of the thymus.** J Comp Pathol 2010, 142: S111-5.
- Atalay M, Marnila P, Lilius EM, Hanninen O, Sen CK. **Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats.** Eur J Appl Physiol 1996, 74: 342-7.
- Aw D, Silva AB, Palmer DB. **Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population.** Immunology 2007, 120: 435-46.
- Babior BM. **NADPH oxidase: an update.** Blood 1999, 93: 1464-76.
- Bacaicoa San Martin J. **Conceptos generales. Terminología. Curas balnearias como agentes terapéuticos. Bases biológicas.** En: Hernández Torres *et al.* Técnicas y tecnologías en hidrología médica e hidroterapia. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS), Instituto de Salud Carlos III, Madrid. 2006, 50: pp. 27-32.
- Bae ChY, Kang YG, Kim S, Cho Ch, Kang HCh, Yu BY, Lee S, Cho KH, Lee DCh, Lee K, Kim JS, Shin KK. **Development of models for predicting biological age (BA) with physical, biochemical, and hormonal parameters.** Arch Gerontol Geriatr 2008, 47: 253-65.
- Baeza I, Alvarado C, Alvarez P, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Fdez-Tresguerres JA, De la Fuente M. **Improvement of leukocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens.** J Reprod Immunol 2009, 80: 70-9.
- Baeza I, Alvarado C, Ariznavarreta C, Castillo C, Tresguerres JA, De la Fuente M. **Effect of growth hormone treatment on lymphocyte functions in old male rats.** Neuroimmunomodulation 2008, 15: 279-84.
- Baeza I, De Castro NM, Giménez-Llort L, De la Fuente M. **Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems.** J Neuroimmunol 2010, 219: 90-9.
- Bagasra O, Howedy A, Kajdacsy-Balla A. **Macrophage function in chronic experimental alcoholism. I. Modulation of surface receptors and phagocytosis.** Immunology 1988, 65: 405-9.
- Bai X, Han L, Liu Q, Shan H, Lin H, Sun X, Chen XM. **Evaluation of biological aging process – a population-based study of healthy people in China.** Gerontology 2010, 56: 129-40.
- Bailey MT, Engler H, Powell ND, Padgett DA, Sheridan JF. **Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007, 293: R1180-90.

- Banaclocha MM. **Therapeutic potential of N-acetylcysteine in aged-related mitochondrial neurodegenerative diseases.** Med Hypotheses 2001, 56: 472-7.
- Barbelivien A, Herbeaux K, Oberling P, Kelche C, Galani R, Majchrzak M. **Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat.** Behav Brain Res 2006, 169: 231-8.
- Barja G. **Free radicals and aging.** Trends Neurosci 2004, 27: 595-600.
- Barja G. **Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity.** Free Rad Biol Med 2002, 33: 1167-72.
- Barja G. **Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects and confounding concepts.** Antioxid Redox Signal 2013, 19: 1420-45.
- Barreau F, Ducos de Lahitte J, Ferrier L, Frexinos J, Bueno L, Fioramonti J. **Neonatal maternal deprivation promotes Nippostrongylus brasiliensis infection in adult rats.** Brain Behav Immun 2006, 20: 254-60.
- Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. **Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats.** Gut 2004; 53: 501-6.
- Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L, Kiloh LG, Penny R. Depressed lymphocyte function after bereavement. Lancet 1977, 1: 834-6.
- Bauer ME, De la Fuente M. **The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence.** Mech Ageing Dev 2016, 158: 27-37.
- Bauer ME, Jeckel CM, Luz C. **The role of stress factors during aging of the immune system.** Ann N Y Acad Sci 2009, 1153: 139-52.
- Bauer ME. **Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system.** Stress 2005, 8: 69-83.
- Beato M, Sanchez-Pacheco A. **Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex.** Endocr Rev 1996, 17: 587-609.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Zastrow MV, Beattie MS, Malenka RC. **Control of synaptic strength by glial TNF.** Science 2002, 295: 2282-5.
- Beck KD, Luine VN. **Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions.** Physiol Behav 2002, 75: 661-73.

- Beebe SJ, Blackmore PF, White J, Joshi RP, Schoenbach KH. **Nanoseconds pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms.** *Physiol Meas* 2004, 25: 1077-93.
- Beebe SJ, White J, Blackmore PF, Deng Y, Somers K, Schoenbach KH. **Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues.** *DNA Cell Biol* 2003, 22: 785-96.
- Beer AM, Jobst D. **Spa therapy and rehabilitation-what the resident doctor should know.** *MMW FortSCHR Med* 2016, 158: 60-4.
- Beers RF, Sizer IW. **A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase.** *J Biol Chem* 1952, 195: 133-40.
- Bell JA, Livesey PJ, Meyer JF. **Environmental enrichment influences survival rate and enhances exploration and learning but produces variable responses to the radial maze in old rats.** *Dev Psychobiol* 2009, 51: 564-78.
- Bellinger DL, Madden KS, Lorton D, Thyagarajan S, Felten DL. **Age-related alterations in neural-immune interactions and neural strategies in immunosenescence.** En: Ader R, Felten DL, Cohen N, Eds. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press 2001, pp. 241-86.
- Belmin J, Bernard C, Corman B, Merval R, Esposito B, Tedgui A. **Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats.** *Am J Physiol* 1995, 268: H2288-93.
- Belsky DW, Caspi A, Houts R, Cohen HJ, Corcoran DL, Danese A, Harrington H, Israel S, Levine ME, Schaefer JD, Sugden K, Williams B, Yashin AI, Poulton R, Moffitt TE. **Quantification of biological aging in young adults.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112: E4104-10.
- Belzung C, Griebel G. **Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review.** *Behav Brain Res* 2001, 125: 141-9.
- Benaroya-Milshtein N, Apter A, Yaniv I, Kukulansky T, Raz N, Haberman Y, Halpert H, Pick CG, Hollander N. **Environmental enrichment augments the efficacy of idiotype vaccination for B-cell lymphoma.** *J Immunother* 2007, 30: 517-22.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. **Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity.** *Eur J Neurosci* 2004, 20: 1341-7.
- Benedetti S, Benvenuti F, Nappi G, Fortunati NA, Marino L, Aureli T, De Luca S, Pagliarani S, Canestrari F. **Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation.** *Eur J Clin Nutr* 2009, 63: 106-12.

- Berenbaum F. **Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).** Osteoarthritis Cartilage 2013, 21: 16-21.
- Berry RJ. **The natural history of the house mouse.** FLd Stud 1970, 3: 219-62.
- Besedovsky H, Del Rey A, Sorkin E. **Immune-neuro-endocrine interactions.** J Immunol 1985, 135: 750-4.
- Besedovsky HO, Del Rey A. **Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity.** Neurochem Res 2011, 36: 1-6.
- Besedovsky HO, Del Rey A. **Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses.** Endocrine Rev 1996, 17: 64-102.
- Besedovsky HO, Del Rey A. **physiology of psychoneuroimmunology: a personal view.** Brain Behav Immun 2007, 21: 34-44.
- Beyer I, Mets T, Bautmans I. **Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2012, 15: 12-22.
- Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M. **Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trpphic factors.** J neurosci 2003, 23: 10999-11007.
- Bhatnagar S, Dallman M. **Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress.** Neuroscience 1998, 84: 1025-39.
- Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA. **Social isolation rearing induces recognition memory deficits and cytoskeletal alterations of neuronal microtubular proteins in rat hippocampus.** Eur J Neurosci 2006, 24: 2894-902.
- Biasi D, Carletto A, Dell'Agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. **Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects.** Inflammation 1996, 20: 673-81.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A. **Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability.** Circulation 1999, 23: 855-60.
- Biegon A, Duvdevani R, Greenberger V, Segal M. **Aging and brain cholinergic muscarinic receptors: an autoradiographic study in the rat.** J Neurochem 1988, 51: 1381-5.
- Bilkei-Gorzó A, Gyertyán I. **Some doubts about the basic concept of hole-board test.** Neurobiology (Bp) 1996, 4: 405-15.



- Bitzer OK, Romero R, Romero LA, Hernández JJ, Velázquez IE, Flores LJ, González ED, Ortiz GG, Pacheco FP. **Nutrisim® diminishes lipopolysaccharide-stimulated anti-inflammatory IL-4 and IL-10 cytokines and nitric oxide.** IJMSHC 2013; 1: 8-12.
- Blalock JE. **A molecular basis for bidirectional communication between the immune and the neuroendocrine systems.** Physiol Rev 1989, 69: 1-32.
- Blalock JE. **The immune system as a sensory organ.** J Immunol 1984, 132: 1067-70.
- Blalock JE. **The immune system as the sixth sense.** J Intern Med 2005, 257: 126-138.
- Blasco MA. **Telomere length, stem cells and aging.** Nat Chem Biol 2007, 3: 640-9.
- Boehmer ED, Meehan MJ, Cutro BT, Kovacs EJ. **Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway.** Mech Ageing Dev 2005, 126: 1305-13.
- Bojjawar T, Jalari M, Aamodt E, Ware MF, Haynie DT. **Effect of electromagnetic nanopulses on *C. elegans* fertility.** Bioelectromagnetics 2006, 27: 515-20.
- Boonekamp JJ, Simons MJ, Hemerik L, Verhulst S. **Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age.** Aging Cell 2013, 12: 330-2.
- Borkan A, Norris AH. **Assessment of biological age using a profile of physical parameters.** J Gerontol 1980, 35: 177-84.
- Borras C, Gambini J, Viña J. **Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males.** Front Biosci 2007, 12: 1008-13.
- Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. **Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?** Psychopharmacology 2002, 163: 121-41.
- Bosch JA, Ring C, de Geus EJC, Veerman ECI, Amerongen AV. **Stress and secretory immunity.** Int Rev Neurobiol 2002, 52: 213-53.
- Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. **Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways.** Oxid Med Cell Longev 2009, 2: 63-7.
- Bourke CH, Neigh GN. **Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic.** Horm Behav 2011; 60: 112-20.
- Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. **Human lymphocyte repertoires in ageing.** Curr Opin Immunol 2013, 25: 511-5.

- Boyden SV. **The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes.** J Exp Med 1962, 115: 453-6.
- Brain P, Benton D. **The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats.** Life Sci 1979, 24: 99-115.
- Broadhurst PL. **Psychogenetics of emotionality in the rat.** Ann N Y Acad Sci 1969, 159: 806-24.
- Brock MA, Chrest F. **Differential regulation of actin polymerization following activation of resting T lymphocytes from young and aged mice.** J Cell Physiol 1993, 157: 367-8.
- Broekkamp CL, Rijik HW, Joly-gelouin D, Lloyd KL. **Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice.** Eur J Pharmacol 1986, 126: 223-9.
- Brown KJ, Grunberg NE. **Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females.** Physiol Behav 1995, 58: 1085-9.
- Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. **Decreased natural killer cell activity is associated with atherosclerosis in elderly humans.** Exp Gerontol 2001, 37: 127-36.
- Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhøj P, Pedersen BK. **TNF-alpha, leptin, and lymphocyte function in human aging.** Life Sci 2000, 67: 2721-31.
- Bruunsgaard H. **Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations.** Eur Cytokine Netw 2002, 13: 389-91.
- Brydon L, Walker C, Wawrzyniak A, Whitehead D, Okamura H, Yajima J, Tsuda A, Steptoe A. **Synergistic effects of psychological and immune stressors on inflammatory cytokine and sickness responses in humans.** Brain Behav Immun 2009, 23: 217-24.
- Bulloch K, Cullen MR, Schwartz RH, Longo DL. **Development of innervation within syngeneis thymus tissue transplanted under the kidney capsule of the nude mouse: a light and ultrastructural microscope study.** J Neurosci Res 1987, 18: 16-27.
- Bult A, Lynch CB. **Nesting and fitness: lifetime reproductive success in house mice bidirectionally selected for thermoregulatory nest-building behavior.** Behav Genet 1997, 27: 231-40.
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. **Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans.** J Leukoc Biol 2001, 70: 881-6.

- Butler TR, Ariwodola OJ, Weiner JL. **The impact of social isolation on HPA axis function, anxiety-like behaviors, and ethanol drinking.** Front Integr Neurosci 2014, 7: 102.
- Butterfield NN, Graf P, Ries CR, MacLeod BA. **The effect of repeated isoflurane anesthesia on spatial and psychomotor performance in young and aged mice.** Anesth Analg 2004, 98: 1305-11.
- Cacioppo JT, Hawkley LC, Berntson GG, Ernst JM, Gibbs AC, Stickgold R, Hobson JA. **Do lonely days invade nights? Potential social modulation of sleep efficiency.** Psychol Sci 2002, 13: 384-7.
- Cacioppo JT, Hawkley LC, Crawford LE, Ernst JM, Burleson MH, Kowalewski RB, Malarkey WB, Van Cauter E, Berntson GG. **Loneliness and health: potential mechanisms.** Psychosom Med 2002, 64: 407-17.
- Cacioppo JT, Hawkley LC. **Perceived social isolation and cognition.** Trends Cogn Sci 2009, 13: 447-54.
- Cacioppo JT, Hawkley LC. **Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms.** Perspect Biol Med 2003, 46: S39-52.
- Calabrese E. **Hormesis: Changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status.** Mutant Res 2002, 511: 181-9.
- Calabrese EJ, Dhawan G, Kapoor R, Iavicoli I, Calabrese V. **What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity?** Biogerontology 2015, 16: 693-707.
- Camous X, Pera A, Solana R, Larbi A. **NK cells in healthy and age-associated diseases.** J Biomed Biotechnol 2012: 195956.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** Nat Rev Cell Biol 2007, 8: 729-40.
- Cannizzo ES, Clement CC, Shu R, Follo C, Santambrogio L. **Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence.** J Proteomics 2011, 74: 2313-23.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. **Neuroendocrine pharmacology of stress.** Eur J Pharmacol 2003, 463: 235-72.
- Cartier A, Côté M, Lemieux I, Périusse L, Tremblay A, Bouchard C, Deprés JP. **Age-related differences in inflammatory markers in men: contribution of visceral adiposity.** Metabolism 2009, 58: 1452-8.
- Castle SC, Uyemura K, Fulop T, Makinodan T. **Host resistance and immune responses in advanced aged.** Clin Geriatr Med 2007, 23: 463-79.
- Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Amrstrong C, Wang H, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. **A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following**

- acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats.** Pain 2001, 94: 231-44.
- Chang L, Jiang CS, Ernst T. **Effect of age and sex on brain glutamate and other metabolites.** Mag Res Ima 2009, 27: 142-5.
- Chauveau F, Piérard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Béracochéa D. **The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions.** Neurobiol Learn Mem 2009, 91: 447-55.
- Chelvarajan RL, Liu Y, Popa D, Getchell ML, Getchell TV, Stromberg AJ, Bondada S. **Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages.** J Leukoc Biol 2006, 79: 1314-27.
- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, Maier CM, Narasimhan P, Goeders CE, Chan PH. **Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection.** Antioxid Redox Signal 2011, 14: 1505-17.
- Chida Y, Sudo N, Mori J, Kubo C. **Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM).** Brain Res 2006, 1067: 201-8.
- Chikanza IC. **Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations.** Ann N Y Acad Sci 1999, 876: 119-30.
- Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS. **The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1997, 52: M201-8.
- Cohen S, Doyle W, Skoner D. **Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness.** Psychosom Med 1999, 61: 175-80.
- Cohen S, Herbert TB. **Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology.** Annu Rev Psychol 1996, 47: 113-42.
- Cohen S, Miller GE, Rabin BS. **Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature.** Psychosom Med 2001, 63: 7-18.
- Cohen S, Tyrrel DA, Smith AP. **Psychological stress in humans and susceptibility to the common cold.** N Engl J Med 1991, 325: 606-12.
- Colaïanna M, Schiavone S, Zotti M, Tucci P, Morgese MG, Bäckdahl L, Holmdahl R, Krause KH, Cuomo V, Trabace L. **Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress.** Antioxid Redox Signal 2013, 18: 1385-99.

- Cole SW, Hawkley LC, Arevalo JM, Cacioppo JT. **Transcript origin analysis identifies antigen-presenting cells as primary targets of socially regulated gene expression in leukocytes.** Proc Natl Acad Sci U S A 2011, 108: 3080-5.
- Cole SW, Hawkley LC, Arevalo JM, Sung CY, Rose RM, Cacioppo JT. **Social regulation of gene expression in human leukocytes.** Genome Biology 2007, 8: R189.
- Cole SW. **Social regulation of leukocyte homeostasis: the role of glucocorticoid sensitivity.** Brain Behav Immun 2008, 22: 1049-55.
- Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Di Lorenzo G, Listi F, Vitello S, Lio D, Candore G, Clesi G, Caruso C. **Memory B cell subpopulations in the aged.** Rejuvenation Res 2006, 9: 149-52.
- Conti V, Izzo V, Corbi G, Russomanno G, Manzo V, De Lise F, Di Donato A, Filippelli A. **Antioxidant supplementation in the treatment of aging-associated diseases.** Front Pharmacol 2016, 7: 24.
- Coppack SW. **Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue.** Proc Nutr Soc 2001, 60: 349-56.
- Costa-Pinto FA, Palermo-Nieto J. **Neuroimmune interactions in stress** Neuroimmunomodulation 2010, 17: 196-9.
- Couillard-Després S. **Hippocampal neurogenesis and ageing.** Curr Top Behav Neurosci 2013, 15: 343-55.
- Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED, Mormede P. **Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis.** Brain Res 1996, 743: 77-85.
- Cousins N. **Belief becomes biology.** Advances 1989, 6: 20-9.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. **The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication.** Curr Pharm Des 2014, 20: 4608-28.
- Csaba G. **Hormones in the immune system and their posible role. A critical review.** Acta Microbiol Immunol Hung 2014, 61: 241-60.
- Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, Edwards JG, Kaley G. **Aging-induced pro-inflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries.** FASEB J 2003, 17: 1183-5.
- Csiszar AM, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. **Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB.** J Appl Physiol 2008, 105: 1333-41.

- Dalboni TM, Abe AE, de Oliveira CE, Lara VS, Campanelli AP, Gasparoto CT, Gasparoto TH. **Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging.** Cytokine 2013, 61: 716-9.
- Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z. **Chronic mild stress impact: are females more vulnerable?** Neuroscience 2005, 135: 703-14.
- Dallman MF. **Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future.** Front Neuroendocrinol 2005; 26: 103-8.
- Damtew B, Spagnuolo PJ, Goldsmith GG, Marino JA. **Neutrophil adhesion in the elderly: inhibitory effects of plasma from elderly patients.** Clin Immunol Immunopathol 1990, 54: 247-55.
- Danese A, Pariante CM, Caspi A, Taylor A, Poulton R. **Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study.** Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104: 1319-24.
- Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER. **Central corticosteroid actions: Search for gene targets.** Eur J Pharmacol 2008, 583: 272-89.
- Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. **Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression.** Eur J Neurosci 2001, 14: 675-89.
- Daynes RA, Enioutina EY, Jones DC. **Role of redox imbalance in the molecular mechanisms responsible for immunosenescence.** Antioxid Redox Signal 2003, 5: 537-48.
- De Angulo A, Faris R, Daniel B, Jolly C, deGraffenried L. **Age-related increase in IL-17 activates proinflammatory signaling in prostate cells.** Prostate 2015, 75: 449-62.
- De Boer SF, Koolhaas JM. **Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology.** Eur J Pharmacol 2003, 463: 145-61.
- De Cabo C, Pujol A, Viveros MP. **Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders.** Pharmacol Biochem Behav 1995, 50: 277-86.
- De Castro De Frutos NM. **La obesidad, un estado de envejecimiento prematuro: estudio conductual, inmunitario y de estrés oxidativo en modelos murinos.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
- De Flora S, Izzoti A, D'Agostini F, Cesarone CF. **Antioxidant activity and other mechanisms of thiol involved in chemoprevention of mutation and cancer.** Am J Med 1991, 91: 122-30.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. **Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?** Trends in Neurosciences 1999, 22: 422-6.

- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. **Brain corticosteroid receptor balance in health and disease.** Endocr Rev 1998, 19: 269-301.
- De la Fuente M, Baeza I, Guayerbas N, Puerto M, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Tresguerres JA. **Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats.** Biogerontology 2004a, 5: 389-400.
- De la Fuente M, Carazo M, Correa R, Del Río M. **Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs alter different amounts of vitamin E ingestion.** British J Nutr 2000, 84: 25-9.
- De la Fuente M, Carrasco M, Hernanz A. **Modulation of human neutrophil function in vitro by gastrin.** J Endocrinol 1997, 153: 475-83.
- De la Fuente M, Cruces J, Hernández O, Ortega E. **Strategies to improve the function and redox state of the immune system.** Curr Pharm Des 2011, 17: 3966-93.
- De la Fuente M, Del Río M, Medina S. **Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions.** J Neuroimmunol 2001a, 116: 156-67.
- De la Fuente M, Giménez-Llort L. **Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement.** Neuroimmunomodulation 2010, 17: 213-6.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Alvarez P, Alvarado C. **Changes with age in peritoneal macrophage functions. Implication of leukocytes in the oxidative stress of senescence.** Cell Mol Biol 2004b, 50: 683-90.
- De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. **Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women.** Free Radic Res 2008b, 42: 272-80.
- De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, Guayerbas N, Fernández B, Viveros MP. **Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice.** Neurochem Int 2003, 43: 165-72.
- De la Fuente M, Hernanz A, Vallejo C. **The immune system in the oxidation stress conditions of aging and hypertension. Favorable effects of antioxidants and physical exercise.** Antiox Redox Signal 2005, 7: 1356-66.
- De la Fuente M, Llorente R, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, Cruces J, Viveros MP. **Early maternal deprivation in rats. A proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions.** Ann N Y Acad Sci 2009, 1153: 176-83.
- De la Fuente M, Medina S, Del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. **Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides.** Life Sci 2000, 67: 2125-35.

- De la Fuente M, Medina S, del Río M, Ferrández MD, Hernanz A. **Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides**. Life Science 2000, 67: 2125-35.
- De la Fuente M, Medina S. **NPY and phagocytic cell functions**. En: Zukowska ZaF, G. Z. (ed.). The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer. Basilea, Suiza 2005, pp. 107-22.
- De la Fuente M, Miquel J, Catalán MP, Victor VM, Guayerbas N. **The amount of thiolic antioxidant ingestion hended to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice**. Free Rad Res 2002, 36: 119-26.
- De la Fuente M, Miquel J. **An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging**. Curr Pharm Des 2009, 15: 3003-26.
- De la Fuente M, Victor VM. **Anti-oxidants as modulators of immune function**. Immunol Cell Biol 2000, 78: 49-54.
- De la Fuente M. **Changes in macrophage function with aging**. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1985, 81: 935-8.
- De la Fuente M. **Changes in the macrophage function with aging**. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 1985, 81: 935-8.
- De la Fuente M. **Efecto de los antioxidantes en la modulación de la función inmunitaria. Cambios con la edad**. Tesis doctoral, Universidad Miguel Hernández, 2015.
- De la Fuente M. **Envejecimiento del sistema inmunitario**. En: Sastre J, Pamplona R, Ramón JR, Eds. Biogerontología Médica. Madrid: Ergon 2009, pp. 135-52.
- De la Fuente M. **Inmunosenescencia**. En: Abizanda P, Ed. Tratado de Medicina Geriátrica. Elsevier España 2014b, pp. 134-41.
- De la Fuente M. **Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes: improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with Sulphur-containing antioxidants**. Proc Nutr Soc 2010, 69: 651-9.
- De la Fuente M. **Role of neuroimmunomodulation in aging**. Neuroimmunomodulation 2008a, 15: 213-23.
- De la Fuente M. **The immune system, a marker and modulator of the rate of aging**. En: Massoud A, Rezaei N, Eds. Immunology of Aging. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014a, pp. 3-23.
- De La Rosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, Tarazona R, Solana R. **Immunological biomarkers of ageing in man: changes in**



- both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity.** Biogerontology 2006, 7: 471-81.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. **Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity.** FEBS Lett 2005, 579: 2035-9.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. **Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly.** Exp Mol Pathol 2006, 80: 219-27.
- Deacon R. **Assesing burrowing, nest construction, and hoarding in mice.** J Vis Exp 2012, e2607.
- Deacon RM. **Assesing nest building in mice.** Nat Protoc 2006, 1: 1117-9.
- Deacon RMJ, Rawlins JNP. **Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice.** Behav Brain Res 2005, 156: 241-9.
- Decker MW. **The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system.** Brain Res Rev 1987, 12: 423-38.
- Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, De Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. **Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat.** J Neural Transm 2007a, 114: 43-8.
- Del Arco A, Segovia G, Garrido P, De Blas M, Mora F. **Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats.** Behav Brain Res 2007b, 176: 267-73.
- Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. **Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C.** Peptides 1994, 15: 15-22.
- Delahanty DL, Dougall AL, Schmitz JB, Hawken L, Trakowski JH, Jenkins FJ, Baum A. **Time course of natural killer cell activity and lymphocyte proliferation in response to two acute stressors in healthy men.** Health Psychol 1996, 15: 48-55.
- Dellu F, Mayo W, Vallée M, Le Moal M, Simon H. **Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats.** Brain Res 1994, 653: 51-56.
- DeRijk R, Petrides J, Deuster P, Gold PW, Sternberg EM. **Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans.** J Clin Endocrinol Metab 1996, 81: 228-35.

- Dhabhar FS, McEwen BS. **Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity *in vivo*: a potential role for leukocyte trafficking.** Brain Behav Immun 1997, 11: 286-93.
- Dhabhar FS. **Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin.** Clin Dermatol 2013, 31: 18-30.
- Di Lorenzo G, Balistreri CR, Candore G, Cigna D, Colombo A, Romano GC, Colucci AT, Gervasi F, Listì F, Potestio M, Caruso C. **Granulocyte and natural killer activity in the elderly.** Mech Ageing Dev 1999, 108: 25-38.
- Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, Tasker JG. **Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons.** Endocrinology 2005; 146: 4292-301.
- Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. **Changes in the structural complexity of the aged brain.** Aging Cell 2007, 6: 275-84.
- Dimitrijevic M, Stanojevic S. **The intriguing mission of neuropeptide Y in the immune system.** Amino Acids 2013, 45: 41-53.
- Dimsdale J. **Psychological stress and cardiovascular disease.** J Am Coll Cardiol 2008, 51: 1237-46.
- Dixon D, Cruess S, Kilbourn K, Klimas N, Fletcher MA, Ironson G, Baum A, Schneiderman N, Antoni MH. **Social support mediates loneliness and human herpesvirus type 6 (HHV-6) antibody titers.** J Appl Soc Psychol 2006, 31: 1111-32.
- Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A, Radojcic MB. **Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats.** Physiol Res 2010, 59: 729-36.
- Doane LD, Adam EK. **Loneliness and cortisol: momentary, day-to-day, and trait associations.** Psychoneuroendocrinology 2010, 35: 430-41.
- Doherty DE, Haslett C, Tonnesen MG, Henson PM. **Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium.** J Immunol 1987, 138: 1762-71.
- Edström E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramírez-León V, Ulfhake B. **Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging.** Physiol Behav 2007, 92: 129-35.
- Edwards KM, Burns VE, Adkins AE, Carroll D, Drayson M, Ring C. **Meningococcal A vaccination response is enhanced by acute stress in men.** Psychosom Med 2008, 70: 147-51.
- Efron DT, Barbul A. **Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1998, 1: 531-538.

- Ekmekcioglu C, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W. **Effect of sulfur baths on natioxidative systems, peroxide cocentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis.** Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd 2002, 9: 216-20.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. **The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system.** Pharmacol Rev 2000, 52: 595-638.
- Elliot GR, Eisdorfer C. **Stress and human health: an analysis and implications of research: a study by the Institute of Medicine, National Academy of Sciences.** New York: Springer 1982.
- Emack J, Matthews SG. **Effects of chronic maternal stress on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) function and behavior: no reversal by environmental enrichment.** Horm Behav 2011, 60: 589-98.
- Emeny RT, Gao D, Lawrence DA. **Beta1-adrenergic receptors on immune cells impair innate defenses against Listeria.** J Immunol 2007, 178: 4876-84.
- Engel GL, Schmale AH. **Conservation withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis.** Ciba Found Symp 1972, 8: 57-75.
- Escorihuela RM, Tobena A, Fernández-Teruel A. **Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats.** Behav Brain Res 1994, 61: 169-73.
- Esiri MM. **Aging and the brain.** J Pathol 2007, 211: 181-7.
- Espinosa-Oliva AM, de Pablos RM, Villarán RF, Argüelles S, Venero JL, Machado A, Cano J. **Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus.** Neurobiol Aging 2011, 32: 85-102.
- Espinoza SE, Guo H, Fedarko N, DeZern A, Fried LP, Xue QL, Leng S, Beamer B, Waltson JD. **Glutathione peroxidase enzyme activity in aging.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2008, 63: 505-9.
- Esquifino AI, Cano P, Jimenez-Ortega V, Fernandez-Mateos P, Cardinali DP. **Neuroendocrine-immune correlates of circadian physiology: studies in experimental models of arthritis, etanol feeding, aging, social isolation, and caloric restriction.** Endocrine 2007, 32: 1-19.
- Esteban-Manzanares G, González-Bermúdez B, Cruces J, De la Fuente M, Li Q, Guinea GV, Pérez-Rigueiro J, Elices M, Plaza GR. **Improved measurement of elastic properties of cells by micropipette aspiration and its application to lymphocytes.** Ann Biomed Eng 2017, doi: 10.1007/s10439-017-1795-7.
- Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Bodnar JC, Glaser R. **Chronic stress, social support, and persistent alterations in the natural killer cell response to cytokines in older adults.** Health Psychol 1994, 13: 291-8.

- Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. **Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults.** Psychosom Med 1996, 58: 264-72.
- Fabris N. **A neuroendocrine-immune theory of aging.** Int J Neurosci 1990, 51: 373-5.
- Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. **Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people.** Eur J Immunol 1993, 23: 2375-8.
- Faherty CJ, Shepherd KR, Hersimtschuk A, Smeyne RJ. **Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism.** Brain Res Mol Brain Res 2005, 134: 170-9.
- Fan X, Wang Y.  **$\beta 2$  adrenergic receptor on T lymphocytes and its clinical implications.** Progress in Natural Science 2009, 19: 17-23.
- Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Catallani B, Kerstens M, Suchecki D. **Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything.** Neurosci Biobehav Rev 2010, 34: 821-34.
- Feder A, Nestler EJ, Charney DS. **Psychobiology and molecular genetics of resilience.** Nat Rev Neurosci 2009, 10: 446-57.
- Felten SY, Felten DL, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowka JA, Livnat S. **Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs.** Prog Allergy 1988, 43: 14-36.
- Felten SY, Felten DL. **Neural-immune interaction.** Prog Brain Res 1994, 100: 157-62.
- Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. **Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and non-survivors.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1995, 50: B378-82.
- Ferland CL, Schrader LA. **Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response.** Neurosci Lett 2011, 489: 154-8.
- Fernández CI, Collazo J, Bauza Y, Castellanos MR, López O. **Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rats: issues for a therapeutic approach in human aging.** Ann NY Acad Sci 2004, 1019: 53-7.
- Fernández-Teruel A, Driscoll P, Gil L, Aguilar R, Tobena A, Escorihuela RM. **Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh)**

- differing in incentive-seeking behavior.** Pharmacol Biochem Behav 2002, 73: 225-31.
- Ferrández MD, Correa R, Del Río M, De la Fuente M. **Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice.** Exp Gerontol 1999, 34: 675-85.
- Ferrández MD. **Modificaciones en la respuesta inmune debidas al ejercicio.** Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1994.
- Ferrando-Martínez S, De la Fuente M, Guerrero JM, Leal M, Muñoz-Fernández MA. **Impact of thymic function in age-related immune deterioration.** Rev Esp Geriatr Gerontol 2013, 48: 232-7.
- Filali M, Lalonde R, Rivest S. **Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease.** Genes Brain Behav 2009, 8: 143-8.
- Filali M, Lalonde R, Rivest S. **Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease.** Neuropharmacology 2011, 60: 930-6.
- File SE, Seth P. **A review of 25 years of the social interaction test.** Eur J Pharmacol 2003, 463: 35-53.
- File SE, Wardill AG. **Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board.** Psychopharmacologia 1975, 44: 53-9.
- Fischer W, Victorin K, Bjorklund A, Williams LR, Vron S, Gage FH. **Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor.** Nature 1987, 329: 65-8.
- Fone KC, Porkess MV. **Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders.** Neurosci Biobehav Rev 2008, 32: 1087-102.
- Fone KC, Shalders K, Fox ZD, Arthur R, Marsden CA. **Increased 5-HT<sub>2C</sub> receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation.** Psychopharmacology 1996; 123: 346-52.
- Fontan G, Llorente F, García Rodríguez MC, Ojeda JA. **Defective neutrophil chemotaxis and hyperimmunoglobulinemia E.** Acta Pediatr Scand 1976, 65: 509-13.
- Forestier R, Erol Forestier FB, Francon A. **Spa therapy and knee osteoarthritis: a systematic review.** Ann Phys Rehabil Med 2016, 59: 216-26.
- Fox C, Merali Z, Harrison C. **Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress.** Behav Brain Res 2006, 175: 1-8.

- Fox K. **Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex.** Neuroscience 2002, 111: 799-814.
- Franceschi C, Bonafé M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** Ann N Y Acad Sci 2000a, 908: 244-54.
- Franceschi C, Bonafé M, Valensin S. **Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space.** Vaccine 2000b, 18: 1717-20.
- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. **INflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans.** Mech Ageing Dev 2007, 128: 92-105.
- Francia N, Cirulli F, Chairotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. **Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins.** Eur J Neurosci 2006, 23: 711-28.
- Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. **Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity.** J neurosci 2002, 22: 7840-3.
- Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. **Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans.** J Immunol 2008, 180: 2741-6.
- Frosch W. **"Taking the waters" – springs, wells, and spas.** FASEB J 2007, 21: 1948-50.
- Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. **Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging.** Aging Cell 2004, 3: 217-26.
- Fundaró A, Pascheró A. **Dietary choline manipulations and behavioral modifications in rats in the early stages of aging.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1991, 15: 677-88.
- Furukawa T, Inoue M, Kajiya F, Inada H, Takasugi S, Fukui S, Takeda H, Abe H. **Assessment of biological age by multiple regression analysis.** J Gerontol 1975, 30: 422-34.
- Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. **Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.** Immunity 1995, 3: 459-73.
- Gambardella P, Greco AM, Sticchi R, Bellotti R, Di Renzo G. **Individual housing modulates daily rhythms of hypothalamic catecholaminergic system**

- and circulating hormones in adult male rats.** Chronobiol Int 1994, 11: 213-21.
- Garcia GG, Miller RA. **Age-related defects in the cytoskeleton signaling pathways of CD4 T cells.** Ageing Res Rev 2011, 10:26-34.
- Garrido A. JJJJ. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2017.
- Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, Santos A, Del Arco A, Segovia G, Mora F. **Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories.** J Neural Transm 2013, 120: 829-43.
- Garrido P. **Aging and stress: path hypotheses, present approaches and perspectives.** Aging Dis 2011, 2: 80-99.
- Gautam N, das S, Mahapatra SK, Chakraborty SP, Kundu PK, Roy S. **Age associated oxidative damage in lymphocytes.** Oxid Med Cell Longev 2010, 3: 275-82.
- Gavrilovic L, Spasojevic N, Dronjak S. **Chronic individual housing-induced stress decreased expression of catecholamine biosynthetic enzyme genes and proteins in spleen of adult rats.** Neuroimmunomodulation 2010; 17: 265-9.
- Ghersetich I y Lotti T. **Immunologic aspects: Immunology of mineral water spas.** Clinics in Dermatology 14: 563-6.
- Ghia JE, Blennerhassett P, Collins SM. **Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression.** J Clin Invest 2008, 118: 2209-18.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. **Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes.** Free Radic Res 2006, 40: 495-505.
- Gilad GM, Gilad VH. **Strain, stress, neurodegeneration and longevity.** Mech Ageing Dev 2000, 78: 75-83.
- Gillis S, Kozak R, Durante M, Weksler ME. **Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans.** J Clin Invest 1981, 67: 937-42.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. **The immune system in the elderly: III. Innate immunity.** Immunol Res 1999, 20: 117-26.
- Giralt M, Armario A. **Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats.** Physiol Behav 1989, 45: 477-81

## Referencias

---

- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Speicher CE, Holliday JE. **Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency.** J Behav Med 1985, 8: 249-60.
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. **Chronic stress modulates the virus-specific immune response to latent herpes simplex virus type-1.** Ann Behav Med 1997, 19: 78-82.
- Glaser R, MacCallum RC, Laskowski BF, Malarkey WB, Sheridan JF, Kiecolt-Glaser JK. **Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001, 56: M477-82.
- Glaser R, Rice J, Sheridan J, Fertel R, Stout J, Speicher C, Pinsky D, Kotur M, Post A, Beck M. **Stress-related immune suppression: health implications.** Brain Behav Immun 1987, 1: 7-20.
- Glaser R, Sheridan J, Malarkey WB, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK. **Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine.** Psychosom Med 2000, 62: 804-7.
- Globerson A, Effros RB. **Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged.** Immunol Today 2000, 21: 515-21.
- Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F. **Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety.** Neurosci Lett 2015, 584: 93-6.
- Goh J, Ladiges W. **Voluntary wheel running in mice.** Curr Protoc Mouse Biol 2015, 5: 283-90.
- Goldstein DR. **Aging, imbalanced inflammation and aviral infection.** Virulence 2010, 1: 295-8.
- Gomez A, Sanchez-Roman I, Gomez J, Cruces J, Mate I, Lopez-Torres M, Naudi A, Portero-Otin M, Pamplona R, De la Fuente M, Barja G. **Lifelong treatment with atenolol decreases membrane fatty acid unsaturation and oxidative stress in heart and skeletal muscle mitochondria and improves immunity and behavior, without changing mice longevity.** Aging Cell 2014, 13: 551-60.
- Gomez-Ochoa I, Gomez-Ochoa P, Gomez-Casal F, Cativiela E, Larrad-Mur L. **Pulsed electromagnetic fields decrease proinflammatory cytokine secretion (IL-1beta and TNF-alpha) on human fibroblast-like cell culture.** Rheumatol Int 2010, 31: 1283-9.
- Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T. **Low serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly.** Clin Exp Immunol 1996, 106: 120-6.
- Gonzalez-Renovato ED, Alatorre-Jimenez M, Bitzer-Quintero O, Sanchez-Luna S, Flores-Alvarado LJ, Romero-Davalos R, Romero L, Hernández-Anadalon JJ,



- Ortiz GG, Pacheco-Moises FP. **Effect of Nutrisim® on endotoxic shock induced by lipopolysaccharide from *Escherichia coli*: 0111:B4 in rats: structural study of liver, kidney and lung.** J Clin Exp Pathol 2013, 4: 1-5.
- Gonzalez-Renovato ED, Romero-Davalos R, Romero-Tirado LA, Hernandez-Andalon JJ, Velazquez-Brizuela IE, Cruz-Ramos JA, Torres-Sanchez ED, Ortiz GG Pacheco-Moises FP. **Nutrisim® diminishes an endotoxin-stimulated proinflammatory cytokine production.** Am J of Biochem 2012; 2: 94-7.
- Gooney M, messaoudi E, Maher FO, Bramham CR, Lynch MA. **BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events.** Neurobiol Aging 2004, 25: 1323-31.
- Gouin JP, Hantsoo L, Kiecolt-Glaser JK. **Immune dysregulation and chronic stress among older adults: a review.** Neuroimmunomodulation 2008, 15: 251-59.
- Goyns MH. **Genes, telomeres and mammalian ageing.** Mech Ageing Dev 2002, 123: 791-9.
- Gray JA. **Amotility in male and female rodents: a reply to Archer.** Br J Psychol 1979, 70: 425-40.
- Gredilla R, Barja G. **Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity.** Endocrinology 2005, 146: 3713-7.
- Grippe AJ, Cushing BS, Carter CS. **Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation.** Psychosom Med 2007, 69: 149-57.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. **Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response.** J Endocrinol 2011; 209: 153-67.
- Gu H, Tang C, Yang Y. **Psychological stress, immune response, and atherosclerosis.** Atherosclerosis 2012, 223: 69-77.
- Guayerbas N, Catalan M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. **Relation of behaviour and macrophage function to life span in a murine model of premature immunosenescence.** Behav Brain Res 2002b, 134: 41-8.
- Guayerbas N, De la Fuente M. **An impairment of phagocytic function is linked to a shorter life span in two strains of prematurely aging mice.** Dev Comp Immunol 2003, 27: 339-50.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarado C, De la Fuente M. **Effect of diet supplementation with N-acetylcysteine on leucocyte functions in prematurely aging mice.** J Appl Biomed 2005, 3: 199-205.
- Guayerbas N, Puerto M, Alvarez P, De la Fuente M. **Improvement of several macrophage functions in prematurely aging mice by a diet**

- supplemented with thiolic antioxidants.** Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand) 2004, 50: OL677-81.
- Guayerbas N, Puerto M, Ferrández MD, De La Fuente M. **A diet supplemented with thiolic anti-oxidants improves leucocyte function in two strains of prematurely ageing mice.** Clin Exp Pharmacol Physiol 2002c, 29: 1009-14.
- Guayerbas N, Puerto M, Victor VM, Miquel J, De la Fuente M. **Leukocyte function and life span in a murine model of premature immunosenescence.** Exp Gerontol 2002a, 37: 249-56.
- Guayerbas N, Sánchez AI, Gamallo A, Miquel J, De la Fuente M. **Mouse performance in an exploratory activity test as a longevity biomarker.** En: Tur-Mrí JA, Orellana JM (eds) Animal research welfare. A partnership. Laboratory Animals Ltd, Londres, pp. 159-62.
- Guo YP, Liu Y, Li JB, Huang Y, Qi HP, Xie J, Cui XG, Yue ZY, Li WZ. **Chronic  $\beta$ -adrenoceptor antagonists upregulate the rat alveolar macrophage adrenergic system through the  $\beta$ 1-subtype.** Cell Physiol Biochem 2011, 28: 315-22.
- Gutman DA, Nemeroff CB. **Neurobiology of early life stress: rodent studies.** Semin Clin Neuropsychiatry 2002, 7: 89-95.
- Gutman DA, Nemeroff CB. **Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies.** Psychol Behav 2003, 79: 471-8.
- Gyertyán I. **Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying.** Behav Pharmacol 1995, 6: 24-31.
- Hackett RA, Hamer M, Endrighi R, Brydon L, Steptoe A. **Loneliness and stress-related inflammatory and neuroendocrine responses in older men and women.** Psychoneuroendocrinology 2012, 37: 1801-9.
- Hajishengallis G. **Too Old to Fight? Aging and its Toll on Innate Immunity.** Mol Oral Microbiol 2010, 25: 25-37.
- Hale JP, Winlove CP, Petrov PG. **Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties.** Biophys J 2011, 11: 1921-9.
- Hall CS. **Emotional behavior in the rat.** J Comp Psychol 1934, 18: 385-403.
- Hall EH, Schoenbach KH, Beebe SJ. **Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells.** Apoptosis 2007, 12: 1721-31.
- Hamilton GF, Rhodes JS. **Exercise regulation of cognitive function and neuroplasticity in the healthy and diseased brain.** Prog Mol Biol Transl Sci 2015, 135: 381-406.

- Harati H, Barbelivien A, herbeaux K, Muller MA, Engeln M, Kelche C, Cassel JC, Macjchrzak M. **Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan.** Age (dordr) 2013, 35: 1027-43.
- Harbuz M. **Neuroendocrine-immune interactions.** Trends Endocrinol Metab 2003, 14: 51-2.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. **Telomeres shorten during aging of human fibroblast.** Nature 1990, 345: 458-60.
- Harman D. **The biological clock. The mitochondria?.** J Am Geriatr Soc 1972, 20: 99-117.
- Harman D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** J Gerontol 1956, 11: 298-300.
- Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Heimovitz MS, Cohen HJ, Wallace R. **Associations of elevated Interleukin-6 and C-Reactive protein levels with mortality in the elderly.** Am J Med 1999, 106: 506-12.
- Harrison PJ. **The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications.** Psychopharmacology 2004b, 174: 151-62.
- Harrison R. **Physiological roles of xanthine oxidor-reductase.** Drug Metab Rev 2004a, 36: 363-75.
- Harvey BH, Stein DJ, Emsley RA. **The new-generation anti-psychotics: integrating the neuro-pathology and pharmacology of schizophrenia.** SAMJ 1999, 89: 661-72.
- Hasnis E, Reznick AZ. **Antioxidants and healthy aging.** Isr Med Assoc J 2003, 5: 368-70.
- Hatch A, Balazs T, Wiberg GS, Grice HC. **Long-term isolation stress in rats.** Science 1963, 142: 507-10.
- Hatch AM, Wiberg GS, Zawidzka Z, Cann M, Airth JM, Grice HC. **Isolation syndrome in the rat.** Toxicol Appl Pharmacol 1965, 7: 737-45.
- Hattori N. **Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system.** Growth Horm IGF Res 2009, 19: 187-97.
- Hattori S, Hashimoto R, miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. **Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi.** Behav Brain Res 2007, 180: 69-76.

- Hawkley LC, Cole SW, Capitanio JP, Norman GJ, Cacioppo JT. **Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals.** Horm Behav 2012, 62: 314-23.
- Hawkley LC, Masi CM, Berry JD, Cacioppo JT. **Loneliness is a unique predictor of age-related differences in systolic blood pressure.** Psychol Aging 2006, 21: 152-64.
- Hawkley LC, Preacher KJ, Cacioppo JT. **Loneliness impairs daytime functioning but not sleep duration.** Health psychology: official journal of the Division of Health Psychology, American Physiological Association. 2010, 29: 124-9.
- Hayflick L. **Biological aging is no longer an unsolved problem.** Ann N Y Acad Sci 2007, 1100: 1-13.
- Hayflick L. **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** Exp Cell Res 1965, 37: 614-36.
- Hedden T, Grabieli JDE. **Insights into the aging mind: a view from cognitive neuroscience.** Nat Rev Neurosci 2004, 5: 1080-5.
- Hedley DW, Currie GA. **Monocytes and macrophages in malignant melanoma. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes.** Br J Cancer 1978, 37: 747-52.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P. **Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome.** Neuroscience 2000, 100: 749-68.
- Heijnen CJ, Kavelaars A. **The importance of being receptive.** J Neuroimmunol 1999, 100: 197-202.
- Heilbronn LK, Ravussin E. **Caloric restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans.** Am J Clin Nutr 2003, 78: 361-9.
- Helleman KG, Benge LC, Olmstead MC. **Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome.** Brain Res Dev Brain Res 2004, 150: 103-15.
- Henry JP, Wang S. **Effects of early stress on adult affiliative behaviors.** Psychoneuroendocrinology 1998, 23: 863-75.
- Herbert TB, Cohen S. **Stress and immunity in humans: A meta-analytic review.** Psychosom Med 1993, 55: 364-79.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. **Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005; 29: 1201-13.

- Hermes GL, Rosenthal L, Montag A, McClintock MK. **Social isolation and the inflammatory response: sex differences in the enduring effects of a prior stressor.** Am J Physiol Regul Integr Com Physiol 2006, 290: R273-82.
- Hernández O. **Cambios con el envejecimiento en la función y estado redox de leucocitos peritoneales de ratones sometidos a un shock endotóxico. Efectos de intervenciones horméticas y nutricionales.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
- Hernández Torres A, Ramón JR, Cuenca Giralde E, Casado A, López Fernández E. **Capacidad antioxidante de la balneoterapia con aguas mineralo-medicinales sulfuradas y sulfatadas.** Medicina Naturista 2004, 7: 361-70.
- Hernández-Torres A, Ramón JR, Cuenca Giralde E, Casado A, López Fernández E. **Capacidad antioxidante de la balneoterapia con aguas mineralo-medicinales sulfuradas y sulfatadas.** Medicina Naturista 2004, 7: 361-70.
- Herrero C, Sebastian C, Marqués L, Comalada M, Xaus J, Valledor AF, Lloberas J, Celada A. **Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression.** Exp Gerontol 2002, 37: 389-94.
- Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. **Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests.** J Am assoc Lab Anim Sci 2008, 47: 25-31.
- Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C. **Aging and immunity.** Acta Pathol Jpn 1992, 42: 537-48.
- Hirokawa K. **Age-related changes of signal transduction in T cells.** Exp Gerontol 1999, 34: 7-18.
- Hissin PJ, Hilf R. **A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.** Anal Biochem 1976, 74: 214-26.
- Holodick NE, Rothstein TL. **B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells.** Ann N Y Acad Sci 2015, 1362: 176-87.
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Sullivan P, Gough B. **Adrenocortical, beta-endorphin and behavioral responses to graded stressors in differentially reared rats.** Physiol Behav 1988, 42: 125-30.
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Turner BB. **"Isolation stress" revisited: Isolation-rearing effects depend on animal care methods.** Physiol Behav 1991, 49: 1107-18.
- Holt-Lunstad J, Smith TB, Layton JB. **Social relationships and mortality risk: a meta-analytic review.** PLoS Medicine 2010, 7: e1000316.
- House JS, Landis KR, Umberson D. **Social relationships and health.** Science 1988, 241: 540-5.

- Hovatta I, Juhila J, Donner J. **Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders.** *Neurosci Res* 2010, 68: 261-75.
- Huang HJ, Liang KC, Ke HC, Chang YY, Hsieh-Li HM. **Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice.** *Brain Res* 2011, 1371: 150-60.
- Huang MC, Greig NH, Luo W, Tweedie D, Schwartz JB, Longo DL, Ferrucci L, Ershler WB, Goetzl EJ. **Preferential enhancement of older human T cell cytokine generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide.** *Clin Immunol* 2011, 138: 201-11.
- Huber LA, Xu QB, Jurgens G, Bock G, Buhler E, Gey KF, Schonitzer D, Traill KN, Wick G. **Correlation of lymphocyte lipid composition membrane microviscosity and mitogen response in the aged.** *Eur J Immunol* 1991, 21: 2761-5.
- Hugli TE. **Chemotaxis.** *Curr Opin Immunol* 1989, 2: 19-27.
- Hulbert T, Pamplona R, Buffenstein R, Buttermere WA. **Life and death: metabolic rate, membrane composition and lifespan of animals.** *Physiol Rev* 2007, 87: 1175-1213.
- Hurwitz BE, Brownley KA, Motivala SJ, Milanovich JR, Kibler JL, Fillion L, LeBlanc WG, Kumar M, Klimas NG, Fletcher MA, Schneiderman N. **Sympathoimmune anomalies underlying the response to stressful challenge in human immunodeficiency virus spectrum disease.** *Psychosom Med* 2005, 67: 798-806.
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. **Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging.** *Clin Chim Acta* 2001, 305: 75-80.
- Ingram DK. **Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans.** *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2000, 32: 1623-9.
- Inkeles B, Judith B, Kuntz MM, Kadish AS, Weksler ME. **Immunologic studies of aging. III. Cytokinetic basis for the impaired response of lymphocytes from aged humans to plant lectins.** *J Exp Med* 1977, 145: 1176.
- Jankovic BD, Isakovic K, Micic M, Knezevic Z. **The embryonic lympho-neuro-endocrine relationship.** *Clin Immunol Immunopathol* 1981, 18: 108-20.
- Jara EL, Muñoz-Durango N, Ilanos C, Fardella C, González PA, Bueno SM, Kalergis AM, Riedel CA. **Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin.** *Immunol Lett* 2017, 184: 76-83.
- Jaremka LM, Fagundes CP, Glaser R, Bennet JM, Malarkey WB, Kiecolt-Glaser JK. **Loneliness predicts pain, depression, and fatigue: understanding the role of immune dysregulation.** *Psychoneuroendocrinology* 2013, 38: 1310-7.

- Joëls M, Baram TZ. **The neuro-symphony of stress.** Nat Rev Neurosci 2009, 10: 459-66.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER. **The coming out of the brain mineralocorticoid receptor.** Trends in Neurosciences 2008, 31: 1-7.
- Johnson TE, Lithgow GJ. **The search for the genetic basis of aging: the identification of gerontogenes in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** J Am Geriatr Soc 1992, 40: 936-45.
- Jones CA, Brown AM, Auer DP, Fone KC. **The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation-induced recognition memory deficits in the rat.** Psychopharmacology 2011, 214: 269-83.
- Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. **Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses.** Free Radic Biol Med 2002, 33: 1290-300.
- Jones DP. **Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance.** Methods Enzymol 2002, 348: 93-112.
- Joshi RP, Mishra A, Song J, Pakhomov AG, Schoenbach KH. **Stimulation studies of ultrashort high-intensity electric pulse induced action potential block in whole-animal nerves.** IEEE Trans Biomed Eng 2008, 55: 1391-8.
- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP: **Aging and oxidative stress.** Mol Aspects Med 2004, 25: 5-16.
- Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. **Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes.** Biochemistry 2014, 79: 1562-83.
- Kappogiannis D, Mattson MP. **Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease.** Lancet Neurol 2011, 10: 187-198.
- Karagülle M, Karagülle MZ. **Effectiveness of balneotherapy and spa therapy for the treatment of chronic low back pain: a review on latest evidence.** Clin Rheumatol 2015, 34: 207-14.
- Karelina K, Stuller KA, Jarrett B, Zhang N, Wells J, Norman GJ, DeVries AC. **Oxytocin mediates social neuroprotection after cerebral ischemia.** Stroke 2011, 42: 3606-11.
- Karl T, Duffy L, Herzog H. **Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency.** Eur J Neurosci 2008, 28: 173-80.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G, Joëls M. **Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone.** Proc Nat Acad Sci U S A 2005, 102: 19204-7.

- Kasapoglu M, Ozben T. **Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging.** Exp Gerontol 2001, 36: 209-20.
- Kazlauskas V, Pagnussat N, Mioranza S, Kalinine E, Nunes F, Pettenuzzo L, Souza DO, Portela LV, Pociúncula LO, Lara DR. **Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice.** Physiol Behav 2011, 102: 475-80.
- Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y. **The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized Rhesus monkey (Macaca mulatta) model of menopause.** J Reprod Immunol 2001, 50: 41-55.
- Keller-Wood ME, Dallman MF. **Corticosteroid inhibition of ACTH secretion.** Endocr Rev 1984, 5: 124.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. **Neuroplasticity in old age: sustains fivefold induction on hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment.** Ann Neurol 2002, 52: 135-43.
- Kennard JA, Brown KL, Woodruff-Pak DS. **Aging in the cerebellum and hippocampus and associated behaviors over the adult life span of CB6F1.** Neuroscience 2013, 247: 335-50.
- Khanfer R, Phillips AC, Carroll D, Lord JM. **Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress.** Psychosom Med 2010, 72: 636-40.
- Kiecolt-Glaser JK, Garner W, Speicher C, Penn GM, Holliday J, Glaser R. **Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students.** Psychosom Med 1984b, 46: 7-14.
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey WB, Sheridan J. **Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults.** Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93: 3043-7.
- Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Strain EC, Stout JC, Tarr KL, Holliday JE, Speicher CE. **Modulation of cellular immunity in medical students.** J Behav Med 1986, 9: 5-21.
- Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, Glaser R. **Emotions, morbidity, and mortality: new perspectives from psychoneuroimmunology.** Annu Rev Psychol 2002, 53: 83-107.
- Kiecolt-Glaser JK, Newton TL. **Marriage and health: his and hers.** Psychol Bull 2001, 127: 472-503.
- Kiecolt-Glaser JK, Ricker D, George J, Messick G, Speicher CE, Garner W, Glaser R. **Urinary cortisol levels, cellular immunocompetency, and loneliness in psychiatric inpatients.** Psychosom Med 1984a, 46: 15-23.



- Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. **The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2016, 64: 277-84.
- Kimura Y, Kimura H. **Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress.** FASEB J 2004, 18: 1165-7.
- Kirkwood TB. **Gerontology: Healthy old age.** Nature 2008, 455:739-40.
- Kliethermes CL, Crabbe JC. **Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice.** Pharmacol Biochem Behav 2006, 85: 57-65.
- Knight JA. **Review: free radicals, antioxidants, and immune system.** Ann Clin Lab Sci 2000, 30: 145-58.
- Kohut ML, Senchina DS, Madden KS, Felten DL, Moynihan JA. **Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior.** Exp Gerontol 2004, 39: 1347-60.
- Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM, Moller K, Fonsmark L, Qvist J, Madsen PL, Kronborg G, Andersen HO, Skinhoj P, Pedersen BK. **Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia.** Clin Diagn Lab Immunol 2001, 8: 333-8.
- Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright, Miles MP, Ahluwalia N. **Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women.** Mech Ageing Dev 1999, 112: 43-57.
- Krishnaraj R. **Senescence and cytokines modulate the NK cell expression.** Mech Ageing Dev 1997, 96: 89-101.
- Kroenke CH, Kubzansky LD, Schernhammer ES, Holmes MD, Kawachi I. **Social networks, social support, and survival after breast cancer diagnosis.** J Clin Oncol 2006, 24: 1105-11.
- Kuczera M, Kokot F. **The influence of SPA therapy on endocrine system. Stress hormones.** Pol Arch Med Wewn 1996, 95: 11-20.
- Kuebler U, Wirtz PH, Sakai M, Stemmer A, Ehlert U. **Acute stress reduces wound-induced activation of microbicidal potential of ex vivo isolated human monocyte-derived macrophages.** PLoS One 2013, 8: e55875.
- Kulinsky VI. **Biochemical aspects of inflammation.** Biochemistry 2007, 72: 595-607.
- Kuramochi M, Nakamura S. **Effects of postnatal isolation rearing and antidepressant treatment on the density of serotonergic and noradrenergic axons and depressive behavior in rats.** Neuroscience 2009, 163: 448-55.

- Kutza J, Murasko DM. **Age-associated decline in IL-2 and IL-12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples.** Mech Ageing Dev 1996, 90: 209-22.
- Kutza J, Murasko DM. **Effects of aging on natural killer cell activity and activation by interleukin-2 and IFN-alpha.** Cell Immunol 1994, 155: 195-204.
- Kwak C, Lee SH, Kaang BK. **Social isolation selectively increases anxiety in mice without affecting depression-like behavior.** Korean J Physiol Pharmacol 2009, 13: 357-60.
- Kwon HJ, Sung BK, Kim JW, Lee JH, Kim ND, Yoo MA, Kang HS, Baek HS, Bae SJ, Choi JS, Takahashi R, Goto S, Chung Hy. **The effect of lipopolysaccharide on enhanced inflammatory process with age: Modulation of NF-κB.** J Am Aging Assoc 2001, 24: 163-71.
- Lander SS, Linder-Shacham D, Gaisler-Salomon I. **Differential effects on social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression.** Behav Brain Res 2017, 316: 245-54.
- Landmann R. **Beta-adrenergic receptors in human leukocyte sub-populations.** Eur J Clin Invest 1992, 22: 30-6.
- Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. **Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats.** Pharmacol Biochem Behav 2002, 73: 193-207.
- Latham N, Mason G. **From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory.** Applied Animal Behaviour Science 2004, 86: 261-89.
- Laudenslager ML, Reite M, Harbeck RJ. **Supressed immune response in infant monkeys associated with maternal separation.** Behav Neural Biol 1982, 36: 40-8.
- Lawrence RA, Burk RF. **Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver.** Biochem Biophys Res Commun 1976, 71: 952-8.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. **When neurogenesis encounters aging and disease.** Trends Neurosci 2010, 33: 569-79.
- Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. **Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span.** Aging Cell 2010, 9: 527-35.
- Leal-Galicia P, Castaneda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. **Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging.** Neurobiol Learn Mem 2008, 90: 511-8.

- Lee C, Longo V. **Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging.** F1000Res 2016, 5: F1000 Faculty Rev-117.
- Lee JM, Ross ER, Gower A, Paris JM, Martensson R, Lorens SA. **Spatial learning deficits in the aged rat: neuroanatomical and neurochemical correlates.** Brain Res Bull 1994, 33: 489-500.
- Lee RM, Robbins SB. **The relationship between social connectedness and anxiety, self-esteem and social identity.** J Couns Psychol 1998, 45: 338-45.
- Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. **Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice.** Cereb Cortex 2015, 25: 4048-61.
- Lehmann J, Feldon J. **Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing?** Rev Neurosci 2000, 11: 383-408.
- Leidbetseder V, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W, Ekmekcioglu C. **Improving homocysteine levels through balneotherapy: effects of Sulphur baths.** Clin Chim Acta 2004, 343: 105-11.
- Levine JB, Youngs RM, MacDonald ML, Chu M, Leeder AD, Berthiaume F, Konradi C. **Isolation rearing and hyperlocomotion are associated with reduced immediate early gene expression levels in the medial prefrontal cortex.** Neuroscience 2007, 145: 42-55.
- Lewis DA, Glantz LA, Pierri JN, Sweet RA. **Altered cortical glutamate neurotransmission in schizophrenia: evidence from morphological studies of pyramidal neurons.** Ann N Y Acad Sci 2003, 1003: 102-12.
- Li L, Bhatia M, Moore PK. **Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation?** Curr Opin Pharmacol 2006, 6: 125-9.
- Li SC, Rieckmann A. **Neuromodulation and aging: implications of aging neuronal gain control on cognition.** Curr Opin Neurobiol 2014, 29: 148-58.
- Li X, Morrow D, Witkin JM. **Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: comparison with marble burying.** Life Sci 2006, 78: 1933-9.
- Lillard LA, Waite LJ. **Til death do us apart - marital disruption and mortality.** A J Sociol 1995, 100: 1131-56.
- Linton PJ, Dorshkind K. **Age-related changes in lymphocyte development and function.** Nat Immunol 2004, 5: 133-9.
- Lio D, D'Anna C, Gervasi F, Scola L, Potestio M, Di Lorenzo G, Listí F, Colombo A, Candore G, Caruso C. **Interleukin-12 release by mitogen-stimulated mononuclear cells in the elderly.** Mech Ageing Dev 1998, 102: 211-9.

- Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafé M, Cavallone L, Marchegiani F, Olivieri F, Franceschi C, Caruso C. **Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10-1082 promoter SNP.** J Med Genet 2003, 40: 296-9.
- Llorente R, Arranz L, Marco EM, Moreno E, Puerto M, Guaza C, De la Fuente M, Viveros MP. **Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats.** Psychoneuroendocrinology 2007, 32: 636-50.
- Lobby P. **Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease.** Nutr Rev 2007, 65: S140-6.
- Londei T, Valentini AMV, Leone VG. **Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behavior.** Behav Brain Res 1998, 94: 249-54.
- Lopes RP, Grassi-Oliveira R, de Almeida LR, Stein LM, Luz C, Teixeira AL, Bauer ME. **Neuroimmunoendocrine interactions in patients with recurrent major depression, increased early life stress and long-standing stress disorder symptoms.** Neuroimmunomodulation 2012, 19: 33-42.
- Lord JM, Butcher S, Killampali V, Laselles D, Salmon M. **Neutrophil ageing and immunosenescence.** Mech Ageing Dev 2001, 122: 1521-35.
- Lu SC. **Glutathione synthesis.** Biochim Biophys Acta 2013, 1830: 3143-53.
- Lu ST, de Lorge JO. **Biological effects of high peak power radio frequency pulses.** En: Lin J (ed.), Advances in Electromagnetic fields in living systems. Amsterdam, Kluwer 2000, pp. 207-64.
- Lu ZW, Hayley S, Ravindran AV, Merali Z, Anisman H. **Influence of psychosocial psychogenic and neurogenic stressors on several aspects of immune functioning in mice.** Stress 1999, 3: 55-70.
- Lubach GR, Coe CL, Ershler WB. **Effects of early rearing environment on immune responses of infant rhesus monkeys.** Brain Behav Immun 1995, 9: 31-46.
- Luine V, Bowling D, Hearn M. **Spatial memory deficits in aged rats: contributions of monoaminergic systems.** Brain Res 1990, 537: 271-8.
- Luine V, Hearn M. **Spatial memory deficits in aged rats: contributions of the cholinergic system assessed by ChAT.** Brain Res 1990, 523: 321-4.
- Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL. **Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses.** Horm Behav 2009, 55: 248-56.

- Lupien S, Lecours AR, Schwartz G, Sharma S, Hauger RL, Meaney MJ, Nair NPV. **Longitudinal study of basal cortisol levels in healthy elderly subjects: evidence for subgroups.** *Neurobiol Aging* 2001, 17: 95-105.
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. **Thymic involution and immune reconstitution.** *Trends Immunol* 2009, 30: 366-73.
- Maccari S, Mormede P, Piazza PV, Simon H, Angelucci L, Le Moal M. **Hippocampal Type 1 and Type 2 corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic systems.** *Psychoneuroendocrinology* 1992, 17: 103-12.
- Machado A, Herrera AJ, de Pablos RM, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, Ayala A, Venero JL, Santiago M, Villarán RF, Delgado-Cortés MJ, Argüelles S, Cano J. **Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease.** *Rev Neurosci* 2014, 25: 785-804.
- Mackay CR, Imhof BA. **Cell adhesion in the immune system.** *Immunol Today* 1993, 14: 99-102.
- Madden KS, Sanders VM, Felten DL. **Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995, 35: 417-48.
- Madden KS. **Catecholamines, sympathetic innervation and immunity.** *Brain Behav Immun* 2003, 17: 5-10.
- Maier SF, Watkins LR, Nance DM. **Multiple routes of action of interleukin-1 on the nervous system.** En: Ader R, Felten DL, Cohen N (eds.). *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press 2001, pp. 563-585.
- Maier SF, Watkins LR. **Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: implications for cancer and cancer treatments.** *Brain Behav Immun* 2003, 17: S125-31.
- Makrantonaki E, Schonknecht P, Hossini M. **Skin and brain age together: the role of hormones in the ageing process.** *Exp Gerontol* 2010, 45: 801-13.
- Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. **Immunosenescence: a review.** *Arch Gerontol Geriatr* 2001, 32: 1-14.
- Marchetti B, Morale MC, Testa N, Tirolo C, Caniglia A, Amor S, Dijkstra CD, Barden N. **Stress, the immune system and vulnerability to degenerative disorders of the central nervous system in transgenic mice expressing glucocorticoid receptor antisense RNA.** *Brain Res Brain Res Rev* 2001, 37: 259-72.
- Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M, Mela V, Llorente-Berzal A, Prada C, Viveros MP. **The maternal deprivation animal model revisited.** *Neurosci Biobehav Rev* 2015, 51: 151-63.

- Mariani E, Cattini L,, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, Facchini A. **Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status.** Biogerontology 2006, 7: 449-59.
- Mariani E, Sgobbi S, Meneghetti A, Tadolini M, Tarozzi A, Sinoppi M, Cattini L, Facchini A. **Perforins in human cytolytic cells: the effect of age.** Mech Ageing Dev 1996, 92: 195-209.
- Mariggio MA, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, De Rinaldis P, Fumarulo R. **Sulfide enhancement of PMN apoptosis.** Immunopharmacol Immunotoxicol 1998, 20: 399-408.
- Marshall GD Jr, Agarwall SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. **Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students.** Brain Behav Immun 1998, 12: 297-307.
- Martin AL, Brown RE. **The lonely mouse: Verification of a separation-induced model of depression in female mice.** Behav Brain Res 2010, 207: 196-207.
- Martinez de Toda I, Mate I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M. **Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity.** Aging (Albany NY) 2016, 8: 3110-9.
- Massey V, Williams C. **On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase.** J Biol Chem 1965, 240: 4470-81.
- Masuda Y, Ishigooka S, Matsuda Y. **Digging behavior of ddY mouse.** Exp Anim 2000, 49: 235-7.
- Mate I, Cruces J, Giménez-Llort L, De la Fuente M. **Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer's disease.** J Alzheimers Dis 2015, 43: 213-26.
- Mate I, Madrid JA, De la Fuente M. **Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging.** Curr Pharm Des 2014, 20: 4642-55.
- Mate I. **Caracterización de marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en el envejecimiento humano y en un modelo de Alzheimer en ratón.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2015.
- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. **Antioxidant enzymes and human diseases.** Clin Biochem 1999, 32: 595-603.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez F. **Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes.** Front in Biosci 1999, 4: d335-45.
- Mathews IZ, Wilton A, Styles A, McCormick CM. **Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim**

- stress after adolescent social stress in rats.** Behav Brain Res 2008, 190: 33-40.
- Matsubara LS, Machado PE. **Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes.** Braz J Med Biol res 1991, 24: 449-54.
- Matto V, Allikmets L. **Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding.** Pharmacology 1999, 58: 59-69.
- Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. **Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms.** Mech Ageing Dev 2001, 122: 757-78.
- Mattson MP, Magnus T. **Aging and neuronal vulnerability.** Nat Rev Neurosci 2006, 7: 278-94.
- Mattson MP. **Hormesis defined.** Ageing Res Rev 2008, 7: 1-7.
- McArthur WP. **Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells.** Periodontol 2000, 16: 53-79.
- McEwen BS. **Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain.** Metabolism 2005, 54: 20-3.
- McEwen BS. **Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process.** Neurobiol Aging 2002, 23: 921-29.
- McNerlan SE, Rea IM, Alexander HD. **A whole blood method for measurement of intracellular TNF-alpha, IFN-gamma and IL-2 expression in stimulated CD3+ lymphocytes: differences between young and elderly subjects.** Exp Gerontol 2002, 37: 227-34.
- Meagher MW, Sieve AN, Johnson RR, Satterlee D, Belyavvskyi M, Mi W, Prentice TW, Welsh TH Jr, Welsh CJ. **Neonatal maternal separation alters immune, endocrine, and behavioral responses to acute Theiler's virus infection in adult mice.** Behav Genet 2010, 40: 233-49.
- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, senin U. **Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians.** Free Radic Biol Med 2000, 28: 1243-8.
- Medina S, Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. **Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production.** Peptides 2000, 21: 1403-9.
- Medvedev ZA. **An attempt at a rational classification of theories of aging.** Biol Rev 1990, 65: 375-98.

- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG. **Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence.** Am J Clin Nutr 1995, 62: 1462S-76S.
- Miachon S, Rochet T, Mathian B, Barbagli B, Claustrat B. **Long-term isolation of Wistar rats alters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH.** Brain Res Bull 1993, 32: 611-4.
- Michaud M, Balardy L, Moulis G, Peyrot C, Vellas B, Cesari M, Nourhashemi F. **Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases.** J Am Med Dir Assoc 2013, 14: 877-82.
- Mikics E, Kruk MR, Haller J. **Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats.** Psychoneuroendocrinology 2004, 29: 618-35.
- Milanovic Z, Pantelic S, Trajkovic N, Sporis G, Kostic R, James N. **Age-related decrease in physical activity and functional fitness among elderly men and women.** Clinical Interventions in aging 2013, 8: 549-56.
- Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. **Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model.** Health Psychol 2002, 21: 531-41.
- Miller GE, Rohleder N, Stetler C, Kirschbaum C. **Clinical depression and regulation of the inflammatory response during acute stress.** Psychosom Med 2005, 67: 679-87.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Wiesler-Frank J, Tracey KJ, Martin D, Poole S, Maier SF, Watkins LR. **Spinal glia and pro-inflammatory cytokines mediate "anatomically impossible" (mirror image) neuropathic pain.** J Neurosci 2003, 23: 1026-40.
- Miquel J, Blasco M. **A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor.** Exp Gerontol 1978, 13: 389-96.
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. **Mitochondrial role in cell aging.** Exp Gerontol 1980, 15: 575-91.
- Miquel J. **An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications.** Exp Gerontol 1998, 33: 113-26.
- Mitra R, Sapolsky RM. **Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy.** Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105: 5573-8.
- Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K, Nakano Y, Shimoi K. **Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine.** Biochem Biophys Res Commun 2006, 349: 775-80



- Mocchegiani E, Malavolta M. **NK and NKT cell functions in immunosenescence.** Aging Cell 2004, 3: 177-184.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, Gaetti R, Cavalieri E, Suzuki H. **Metallothioneins/PARP-1/IL6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply.** Mech Ageing Dev 2003, 124: 459-68.
- Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. **Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat.** Behav Brain Res 1993, 57: 183-91.
- Mohanty S, Joshi SR, Ueda I, Wilson J, Blevins TP, Siconolfi B, Meng H, Devine L, Raddassi K, Tsang S, Belshe RB, Hafler DA, Kaech SM, Kleinstein SH, Trentalange M, Allore HG, Shaw AC. **Prolonged proinflammatory cytokine production in monocytes modulated by interleukin 10 after influenza vaccination in older adults.** J Infect Dis 2015, 211: 1174-84.
- Möller M, Du Preez JL, Viljoen FP, Berk M, Emsley R, Harvey BH. **Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine.** Brain Behav Immun 2013, 30: 156-67.
- Möller M, DuPreez JL, Emsley R, Harvey BH. **Isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating and social interaction in rats are related to corticostriatal oxidative stress, and reversed by sub-chronic clozapine administration.** Eur Neuropsychopharmacol 2011, 21: 471-83.
- Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. **Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats.** J Neuroendocrinol 2004, 16: 423-31.
- Montembeault M, Joubert S, Doyon J, Carrier J, Gagnon JF, Monchi O, Lungu O, Belleville S, Brambati SM. **The impact of aging on gray matter structural covariance networks.** Neuroimage 2012, 63: 754-9.
- Mooney NA, Smith RE, Watson BW. **Effect of extremely-low-frequency pulsed magnetic fields on the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells.** Bioelectromagnetics 1986, 7: 387-394.
- Mooradian AD, Reed RL, Osterweil D, Scuderi P. **Detectable serum levels of tumor necrosis factor alpha may predict early mortality in elderly institutionalized patients.** J Am Geriatr Soc 1991, 39: 891-4.
- Mora F, Segovia G, del Arco A. **Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain.** Brain Res Rev 2007, 55: 78-88.

- Mora F. **Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle.** Dialogues Clin Neurosci 2013, 15: 45-52.
- Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R. **Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration.** Behav Brain Res 2003, 147:1-8.
- Morel F, Doussiere J, Vignais PV. **The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects.** Eur J Biochem 1991, 201: 523-46.
- Morgan M, Einon D. **Incentive motivation and behavioral inhibition in socially-isolated rats.** Physiol Behav 1975, 15: 405-9.
- Morimoto A, Nakamori T, Morimoto K, Tan N, Murakami N. **The central role of corticotrophin-releasing factor (CRF-41) in psycsiological stress in rats.** J Physiol 1993, 460: 221-9.
- Morris R, Cox H, Mombelli E, Quinn PJ. **Rafts, little caves and large potholes: how lipid structure interacts with membrane proteins to create functionally diverse membrane environments.** Subcell Biochem 2004, 37: 35-118.
- Morrison DC, Chen LC, Pace JL. **Altered regulation of nitric oxide production in vitro by macrophages from senescent mice.** J Leuk 1993, 54: 575-80.
- Mossman TR, Sad S. **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** Immunol Today 1996, 17: 138-46.
- Muhammad MS, Magaji RA, Mohammed A, Isa AS, Magaji MG. **Effect of resveratrol and environmental enrichment on biomarkers of oxidative estress in young healthy mice.** Metab Brain Dis 2017, 32: 163-170.
- Mysliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwski A. **Increased of interleukin 6 and decreased of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status.** Mech Ageing Dev 1998, 100: 313-28.
- Nakamura T, Walker AK, Sominsky L, Allen T, Rosengren S, Hodgson DM. **Maternal separation in early life impairs tumor immunity in adulthood in the F344 rat.** Stress 2011, 14: 335-43.
- Naliboff BD, Benton D, Solomon GF, Morley JE, Fahey JL, Bloom ET, Makinodan T, Gilmore SL. **Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress.** Psychosom Med 1991; 53: 121-32.
- Nasermoaddeli A, Kagamimori S. **Balneotherapy in medicine. A review.** Environ Health Prev Med 2005, 10: 171-9.
- Naudi A, Jove M, Ayala V, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R. **Regulation of membrane unsaturation as antioxidant adaptive mechanisms in long-lived animal species.** Free Rad Antioxid 2011, 1: 3-12.

- Nemeroff CB. **Psychoeuroimmunoendocrinology: the biological basis of mind-body physiology and pathophysiology.** *Depress Anxiety* 2013, 30: 285-7.
- Neveu PJ, Deleplanque B, Puglisi-Allegra S, D'Amato FR, Cabib S. **Influence of early life events on immune reactivity in adult mice.** *Dev Psychobiol* 1994, 27: 205-13.
- Nichols RN. **Glial responses to steroids as markers of brain aging.** *J Neurobiol* 40, 585-601.
- Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. **Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents.** *Front Neurosci* 2014, 8: 166.
- Nithianantharajan J, Hannan AJ. **Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of nervous system.** *Nat Rev Neurosci* 2006, 7: 697-709.
- Niwa Y, Kasam T, Miyachi Y, Kanoh T. **Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies.** *Life Sci* 1989, 44: 1655-64.
- Njung'e K, Handley SL. **Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety.** *Pharmacol Biochem Behav* 1991, 38: 63-7.
- Noelle RJ, Nowak EC. **Cellular sources and immune functions of interleukin-9.** *Nat Rev Immunol* 2010, 10: 683-7.
- Nuccitelli R, Pliquet U, Chen X, Ford W, James Swanson R, Beebe SJ, Kolb JF, Schoenbach KH. **Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 343: 351-60.
- O'Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TPJ, Mealy K. **Quantitative intracellular cytokine measurements age-related changes in proinflammatory cytokine production.** *Clin Exp Immunol* 1998, 113: 213-9.
- Ogata K, An E, Shioi Y, Nakamura K, Luo S, Yokose N, Minami S, Dan K. **Association between natural killer cell activity and infection in immunologically normal elderly people.** *Clin Exp Immunol* 2001, 124: 392-7.
- Ogata K, Yokose N, Tamura H, An E, Nakamura K, Dan K, Nomura T. **Natural killer cells in the later decades of human life.** *Clin Immunol Immunopathol* 1997, 84: 269-75.
- Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim HR, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. **Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide.** *Free Radic Biol Med* 2006, 41: 106-19.

- Oitzl MS, de Kloet ER. **Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning.** Behavioral Neuroscience 1992, 106: 62-71.
- Oitzl MS, Reichardt HM, Joëls M, de Kloet ER. **Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory.** Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98: 12790-5.
- Olovnikov AM. **A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon.** J Theor Biol 1973, 41: 181-90.
- Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR. **Glucocorticoid receptor and NGFI-a gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats.** Mol Brain Res 2004, 23: 349-53.
- Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR. **Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats.** Brain Res Mol Brain Res 1994, 23: 349-53.
- Ongrádi J, Kövesdi V. **Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal.** Immun Ageing 2010, 7: 7.
- Ortega E, Forner MA, Barriga C. **Exercise-induced stimulation of murine macrophages chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators.** J Physiol 1997, 498: 729-34.
- Ortega E, García JJ, De la Fuente M. **Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes.** Exp Physiol 2000a, 85: 519-25.
- Ortega E, García JJ, De la Fuente M. **Modulation of adherence and chemotaxis of macrophage by norepinephrine. Influence of ageing.** Mol Cell Biochem 2000b, 203: 113-7.
- Ortega E, García JJ, Sáez MC, De la Fuente M. **Changes with aging in the modulation of macrophages by norepinephrine.** Mech Ageing Dev 2000c, 118: 103-14.
- Ortega E, Giraldo E, Hinchado MD, Martin L, García JJ, De la Fuente M. **Neuroimmunomodulation during exercise: role of catecholamines as "stress mediators" and/or "danger signal" for the innate immune response.** Neuroimmunomodulation 2007, 14: 206-12.
- Ota M, Yasuno F, Ito H, Seki C, Kozaki S, Asada T, Suhara T. **Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with L-( $\beta$ -<sup>11</sup>C)DOPA.** Life Sci 2006, 79: 730-6.

- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. **Adipokines in inflammation and metabolic disease.** Nat Rev Immunol 2011, 11: 85-97.
- Paban V, Jaffard M, Chambon C, Malafosse M, Alescio-Lautier B. **Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention.** Neuroscience 2005, 132: 13-32.
- Pace TW, Hu F, Miller AH. **Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression.** Brain Behav Immun 2007, 21: 9-19.
- Pacelli C, Coluccia A, Grattagliano I, Cocco T, Petrosillo G, Paradies G, De Nitto E, Massaro A, Persichella M, Borracci P, Portincasa P, Carratú MR. **Dietary choline-deprivation impairs brain mitochondrial function and behavioral phenotype.** J Nutr 2010, 140: 1072-1079.
- Palanza P, Gioiosa L, Parmigiani S. **Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance.** Physiol Behav 2001, 73: 411-20.
- Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M. **Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation.** Ann N Y Acad Sci 2002, 959: 475-90.
- Pamplona R, Barja G. **Aging rate, free radical production, and constitutive sensitivity to lipid peroxidation: insights from comparative studies.** En: Vn Zglinicki T (ed). Biology of aging and its modulation series. Vol 1. Aging at the Molecular Level, New Molecular Level. New York: Kluwer Academic Publishers 2003, pp. 47-64.
- Panda A, Arjona A, Sapey E, Bi F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, Shaw AC. **Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age.** Trends Immunol 2009, 30: 325-33.
- Pandey KB, Rizvi SI. **Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans.** Oxid Med Cell Longev 2010, 3: 2-12.
- Pantelis C, Yucel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Phillips L, McGorry PD. **Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia.** Schizophr Bull 2005, 31: 672-96.
- Pantell M, Rehkopf D, Jutte D, Syme SL, Balmes J, Adler N. **Social isolation: a predictor of mortality comparable to traditional risk factors.** Am J Public Health 2013, 11: 2056-62.
- Pantell, M., Rehkopf, D., Jutte, D., Syme, S.L., Balmes, J., Adler, N., 2013. **Social isolation: a predictor of mortality comparable to traditional clinical risk factors.** Am. J. Public Health. 11, 2056-2062.

- Pareja-Galeano H, Brioché T, Sanchis-Gomar F, Escrivá C, Dromant M, Gómez-Cabrera MC, Viña J. **Effects of physical exercise on cognitive alterations and oxidative stress in APP/PSN1 transgenic model of Alzheimer's disease.** Rev Esp Geriatr Gerontol 2012, 47: 198-204.
- Parmigiani S, Palanza P, Rogers J, Ferrari PF. **Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience.** Neurosci Biobehav Rev 1999, 23: 957-69.
- Pawelec G, Adibzadeh M, Pohla H, Schaudt K. **Immunosenescence: ageing of the immune system.** Immunol Today 1995, 16: 420-2.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fülöp T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E, Solana R. **T cells and aging, January 2002 update.** Front Biosci 2002, 7: d1056-183.
- Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. **Impact of aging on innate immunity.** J Leukoc Biol 1998, 64: 703-12.
- Pedersen BK, Steenberg A, Schjerling P. **Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects.** J Physiol 2001, 536: 329-37.
- Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, Dela F, Pedersen BK. **Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes.** Mech Ageing Dev 2003, 124: 495-502.
- Pedersen WA, Wan R, Mattson MP. **Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems.** Mech Ageing Dev 2001, 122: 963-83.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. **Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J Neurosci Methods 1985, 14: 149-67.
- Pena Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM. **Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats.** Psychoneuroendocrinology 2009, 34: 1390-404.
- Pena Y, Prunell M, Dimitrisantos V, Nadal R, Escorihuela RM. **Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent.** Behav Brain Res 2006; 174: 181-7.
- Penza KM, Heim C, Nemeroff CB. **Neurobiological effects of childhood abuse: implications for the pathophysiology of depression and anxiety.** Arch Womens Ment Health 2003, 6: 15-22.
- Pérez-Álvarez L, Baeza I, Arranz L, Marco EM, Borcel E, Guaza C, Viveros MP, De la Fuente M. **Behavioral, endocrine and immunological characteristics of a murine model of premature aging.** Dev Comp Immunol 2005, 29: 965-76.

- Perrault CM, Bray EJ, Didier N, Ozaki CK, Tran-Son-Tay R. **Altered rheology of lymphocytes in the diabetic mouse.** Diabetologia 2004, 47: 1722-6.
- Perskin MH, Cronstein BN. **Age-related changes in neutrophil structure and function.** Mech Ageing Dev 1992, 64: 303-13.
- Petrie KJ, Booth RJ, Pennebaker JW, Davison KP, Thomas MG. **Disclosure of trauma and immune response to a hepatitis B vaccination program.** J Consult Clin Psychol 1995, 63: 787-92.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH. **Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year.** Neuroscience 1999, 94: 279-86.
- Pietropaolo S, Branchi I, Cirulli F, Chiarotti F, Aloe L, Alleva E. **Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behavior in mice: social versus physical enrichment.** Physiol Behav 2004, 81: 443-53.
- Pinheiro ML, Ferraz-de-Paula V, Ribeiro A, Sakai M, Bernardi MM, Palermo-Neto J. **Long-term maternal separation differentially alters serum corticosterone levels and blood neutrophil activity in A/J and C57BL/6 mouse offspring.** Neuroimmunomodulation 2011, 18: 184-90.
- Poling A, Cleary J, Monaghan M. **Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli.** J Exp Anal Behav 1981, 35: 31-44.
- Powell CM, Miyakawa T. **Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder?** Biol Psychiatry 2006, 59: 1198-207.
- Puerto M, Guayerbas N, Álvarez P, De la Fuente M. **Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice.** J Neuroimmunol 2005, 165: 33-40.
- Puerto M, Guayerbas N, Victor VM, De la Fuente M. **Effects of N-acetylcysteine on macrophage and lymphocyte functions in a mouse model of premature ageing.** Pharmacol Biochem Behav 2002, 73: 797-804.
- Puerto M. **Modulación de la función inmunitaria por noradrenalina y neuropéptidos Y: cambios con el envejecimiento.** Tesis Doctoral 2004, Universidad Complutense de Madrid.
- Pugh CR, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. **The immune system and memory consolidation: a role for cytokine IL-1 $\beta$ .** Neurosci Biobehav Rev 2001, 25: 29-41.
- Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PT. **Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology.** Neurochem Int 2008, 52: 155-65.

- Rabin BS. **Stress, immune function, and health: The connection.** New York: John Wiley & Sons, 1999.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. **The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes.** Eur J Pharmacol 2008, 589: 173-5.
- Rao KM, Currie MS, Padmanabhan J, Cohen HJ. **Age-related alterations in actin cytoskeleton and receptor expression in human leukocytes.** J Gerontol 1992, 47: B37-44.
- Rattan SI, Demirovic D. **Hormesis can and does work in humans.** Dose Response 2009, 8: 58-63.
- Rattan SI. **Gerontogenes: real or virtual?** FASEB J 1995, 9: 284-6.
- Rattan SI. **Homeostasis, homeodynamics, and aging.** En: Birren J, Ed. Encyclopedia of Gerontology. Elsevier Inc. UK 2006, pp. 1-13.
- Rattan SI. **Hormesis in aging.** Ageing Res Rev 2008, 7: 63-78.
- Ravindranath V, Shivakumar BR, Anandatheerthavarada HK. **Low glutathione levels in brain regions of aged rats.** Neurosci Lett 1989, 101: 187-90.
- Redwine L, Mills PJ, Sada M, Dimsdale J, Patterson T, Grant I. **Differential immune cell chemotaxis responses to acute psychological stress in Alzheimer caregivers compared to non-caregiver controls.** Psychosom Med 2004, 66: 770-5.
- Renshaw W, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. **Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging.** J Immunol 2002, 169: 4697-701.
- Reul JM, de Kloet ER. **Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation.** Endocrinology 1985, 117: 2505-11.
- Rhen T, Cidlowski JA. **Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs.** N Engl J Med 2005; 353: 1711-23.
- Richter SH, Gass P, Fuss J. **Resting is rusting: a critical view on rodent wheel-running behavior.** Neuroscientist 2014, 20: 313-25.
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. **Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events.** N Engl J Med 2002, 347: 1557-65.
- Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. **Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3.** Lab Invest 2006, 86: 391-7.



- Rivnay B, Bergman S, Shinitzky M, Globerson A. **Correlations between membrane viscosity, serum cholesterol, lymphocyte activation and aging in man.** Mech Ageing Dev 1980, 12: 1119-26.
- Rivnay B, Globerson A, Shinitzky M. **Viscosity of lymphocyte plasma membrane in aging mice and its possible relation to serum cholesterol.** Mech Ageing Dev 1979, 10:71-9.
- Rizvi SI, Maurya PK. **Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans.** Mol Biotechnol 2007, 37: 58-61.
- Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. **The sterile inflammatory response.** Annu Rev Immunol 2010, 28: 321-42.
- Rodgers RJ, Cole JC. **Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice.** Physiol Behav 1993, 54: 729-36.
- Romanyukha AA, Yashin AI. **Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence.** Mech Ageing Dev 2003, 124: 433-43.
- Romero-Dávalos R, Romero-Tirado LA, Hernández-Andalón JJ, González-Renovato ED, Velázquez-Brizuela IE, Cruz-Ramos JA, Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP. **Nutrisim® protects-against apoptosis in hippocampus induced by transient ischemia in Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus).** HAMDAN MEDICAL JOURNAL, 2011; 4: 40-6.
- Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA. **Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification.** J Neurosci 2010, 30: 5037-46.
- Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. **Stress, memory and the amygdala.** Nat Rev Neurosci 2009, 10: 423-33.
- Rosenzweig MR, Bennett EL. **Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior.** Behav Brain Res 1996, 78: 57-65.
- Ros-Simó C, Valverde O. **Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function.** Pharmacol Biochem Behav 2012, 102: 434-41.
- Roszman TL, Lackson RJ, Cross MJ, Titus WR, Markesberry WR, Brooks H. **Neuroanatomic and neurotransmitter influences of immune function.** J Immunol 1985, 135: 769-72.
- Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. **Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor.** Physiol Behav 2001, 74: 313-20.

- Russo AJ, Howell JH, Han T, Bealmear P, Goldrosen MH. **Isolation of T-cells, B-cells and macrophages by a two-stages adherence procedure.** J Clin Lab Immunol 1979, 2: 67-72.
- Russo SJ, Murrough JW, Han MH, Charney DS, Nestler EJ. **Neurobiology of resilience.** Nat Neurosci 2012, 15: 1475-84.
- Rutter M. **Resilience as a dynamic concept.** Psychopathol 2012, 24: 335-44.
- Sadowska-Bartosch I, Bartosz G. **Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity.** Biomed Res Int 2014, 2014: 404680.
- Sakakibara H, Suzuki A, Kobayashi A, Motoyama K, Matsui A, Sayama K, Kato A, Ohashi N, Akimoto M, Nakayama T, Shimoi K. **Social isolation stress induces hepatic hypertrophy in C57BL/6J mice.** J Toxicol Sci 2012, 37: 1071-6.
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Karniranta K, Suuronen T. **Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging.** Ageing Res Rev 2008, 7: 83-105.
- Salminen A, Kaarniranta K. **Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-kappaB-driven entropic aging process.** Ageing Res Rev 2010, 9: 298-314.
- Salvioli S, Capri S, Valensin S, Tieri P, Monti D, Ottaviani E, Franceschi C. **Inflamm-aging, cytokines and aging: state of the art, new hypothesis on the role of mitochondria and new perspectives from systems biology.** Curr Pharm Des 2006, 12: 3161-71.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP. **Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes.** Free Radic Biol Med 1998, 24: 699-704.
- Sampedro-Piquero P, Begega A, Arias JL. **Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors.** Physiol Behav 2014, 129: 118-29.
- San Martín J, Armiejo-Castro M. **El azufre en las aguas mineralomedicinales: aguas sulfatadas y aguas sulfuradas.** En: Ed. Complutense, Curas Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Madrid. 1994, pp. 243-56.
- Sanchez MM, Aguado F, Sanchez-Toscano F, Saphier D. **Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation.** Endocrinology 1998, 139: 579-87.

- Sanchez-Roman I, Barja G. **Regulation of longevity and oxidative stress by nutritional interventions: role of methionine restriction.** *Exp Gerontol* 2013, 48: 1030-42.
- Sanchez-Roman I, Gomez A, Naudi A, Jove M, Gomez J, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G. **Independent and additive effects of atenolol and methionine restriction on lowering rat heart mitochondria oxidative stress.** *J Bioenerg Biomembr* 2014, 46: 159-72.
- Sanchez-Roman I, Gomez J, Naudi A, Ayala V, Portero-Otin M, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G. **The  $\beta$ -blocker atenolol lowers the longevity-related degree of fatty acid unsaturation, decreases protein oxidative damage and increases ERK signaling in the heart of C57BL/6 mice.** *Rejuvenation Res* 2010, 13: 683-93.
- Sandi C, Venero C, Guaza C. **Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats.** *European Journal of Neuroscience* 1996, 8: 794-800.
- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M. **The immune system in extreme longevity.** *Exp Gerontol* 2008, 43: 61-5.
- Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otín M, Pamplona R, Barja G. **Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins.** *FASEB J* 2006, 20: 1064-73.
- Sanz A, Caro P, Barja G. **Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver.** *J Bioenerg Biomembr* 2004, 36: 545-52.
- Sapolsky R, Armanini M, Packan D, Tombaugh G. **Stress and glucocorticoids in aging.** *Endocrinol Metab Clin* 1987, 16: 965-80.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. **Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81: 6174-7.
- Sarkar D, Fisher PB. **Molecular mechanisms of aging-associated inflammation.** *Cancer Lett* 2006, 236: 13-23.
- Sastre J, Pallardo FV, García de la Asunción J, Viña J. **Mitochondria, oxidative stress and aging.** *Free Radic Res* 2000, 32: 189-98.
- Scaccianoce S, Del Bianco P, Paolone G, Caprioli D, Modafferoi AM, Nencini P, Badiani A. **Social isolation selectively reduces hippocampal brain derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone.** *Behav Brain Res* 2006, 168: 323-5.

- Scheidleder B, Holzer F, Marktl W. **Effect of sulfur administration on lipid levels, antioxidant status and peroxide concentration in heath resort patients.** Forsch Komplementarmed Naturheilkd 2000, 7: 75-8.
- Schliebs R, Arendt T. **The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.** Behav Brain Res 2011, 221: 555-63.
- Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. **Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress.** Mol Psychiatry 2010, 15: 1152-63.
- Schoenbach KH, Joshi R, Kolb J, Buescher S, Beebe S. **Subcellular effects of nanosecond electrical pulses.** Conf Proc IEEE Eng Med Soc 2004, 7: 5447-50.
- Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Würbel H. **Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats.** Pharmacol Biochem Behav 2002, 73: 209-24.
- Schrijver NCA, Pallier PN, Brown VJ, Würbel H. **Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats.** Behav Brain Res 2004, 152: 307-14.
- Schröder AK, Rink L. **Neutrophil immunity of the elderly.** Mech Ageing Dev 2003, 124: 419-25.
- Schubert MI, Porkess MV, Dashdorj N, Fone KC, Auer DP. **Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats.** Neuroscience 2009, 159: 21-30.
- Schubert T, Muller WE. **N-formil-methionyl-leucil-phenilalanine induced accumulation of inositol phosphate indicates the presence of oligopeptide chemoattractant receptors on circulating human lymphocytes.** FEBS Letters 1989, 257: 174-6.
- Seegerstrom SC, Miller GE. **Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry.** Psychol Bull 2004, 130: 601-30.
- Segovia G, Arco AD, Mora F. **Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain.** J Neural Transm (Vienna) 2009, 116: 1007-16.
- Seib DR, Martín-Villalba A. **Neurogenesis in the normal ageing hippocampus: A mini-review.** Gerontology 2015, 61: 327-35.
- Selye H. **Studies on adaptation.** Endocrinology 1937, 21: 169-88.
- Serra M, Pisu MG, Floris I, Biggio G. **Social isolation-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat.** Stress 2005, 8: 259-64.

- Serrajd N, Jamon M. **Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j.** Behav Brain Res 2007, 177: 80-9.
- Shao Y, Yan G, Xuan Y, Peng H, Huang QJ, Wu R, Xu H. **Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus.** Behav Brain Res 2015, 282: 201-8.
- Sharma R, Kapila R, Haq MR, Salingati V, Kapasiya M, Kapila S. **Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses.** Aging Clin Exp Res 2014, 26: 353-62.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. **Aging of the innate immune system.** Curr Opin Immunol 2010, 22: 507-13.
- Shearer GM. **Th1/Th2 changes in aging.** Mech Ageing Dev 1997, 94: 1-5.
- Sherwin CM. **Voluntary wheel running: a review and novel interpretation.** Anim Behav 1998, 56: 11-27.
- Shetty PK, Galeffi F, Turner DA. **Age-induced alterations in hippocampal function and metabolism.** Aging Dis 2011, 2: 196-218.
- Shukkit-Hale B, Smith DE, Meydani M, Joseph JA. **The effects of dietary antioxidants on psychomotor performance in aged mice.** Exp Gerontol 1999, 34: 797-808.
- Sies H. **Biochemistry of oxidative stress.** Angewandte Chem 1986, 25: 1058-71.
- Simell B, Vuorela A, Ekström N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, Kälhly H, Väkeväinen M. **Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of Streptococcus pneumoniae by neutrophil phagocytosis.** Vaccine 2011, 29: 1929-34.
- Simioni PU, Costa EH, Tamashiro WM. **Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice.** Braz J Med Biol Res 2007, 40: 1111-20.
- Simko M, Mattson MO. **Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses *in vitro*: possible immune cell activation.** J Cell Biochem 2004, 93: 83-92.
- Smith RG, Betancourt L, Sun Y. **Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system.** Endocr Rev 2005, 26: 203-50.
- Smyth AM, Lawrie SM. **The neuroimmunology of schizophrenia.** Clin Psychopharmacol Neurosci 2013, 11: 107-17.
- Smythe GM, White JD. **Voluntary Wheel running in dystrophin-deficient (mdx) mice: Relationships between exercise parameters and exacerbation of the dystrophic phenotype.** PLoS Curr 2012, 3: RRN1295.

- Snyderman R, Pike MC. **Chemoattractant receptors on phagocytic cells.** Ann Rev Immunol 1984, 2: 257-81.
- Solana R, Alonso MC, Peña J. **Natural killer cells in healthy aging.** Exp Gerontol 1999, 34: 435-43.
- Solana R, Mariani E. **NK and NK/T cells in human senescence.** Vaccine 2000, 18: 1613-20.
- Soler A, Prieto A, Sevilla I, Ribera D, Reig A, Miquel J. **Biograma: instrument de análisis de edad biológica en grupos poblaciones diversos.** Geriatrika 1992, 8: 3-9.
- Sollazzo V, Palmieri A, Pezzetti F, Massari L, Carinci F. **Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study.** Clin Orthop Relat Res 2010, 468: 2260-77.
- Song C, Vandewoude M, Stevens W, De Clerck L, Van der Planken M, Whelan A, Anisman H, Dossche A, Maes M. **Alterations in immune functions during normal aging and Alzheimer's disease.** Psychiatry Res 1999, 85: 71-80.
- Song L, Kim YH, Chopra RK, Proust JJ, Nagel JE, Nordin AA, Adler WH. **Age-related effects in T cell activation and proliferation.** Exp gerontol 1993, 28: 313-21.
- Southwick SM, Charney DS. **The science of resilience: implications for the prevention and treatment of depression.** Science 2012, 338: 79-82.
- Springer KW, Sheridan J, Kuo D, Carnes M. **Long-term physical and mental health consequences of childhood physical abuse: results from a large population-based sample of men and women.** Child Abuse Negl 2007, 31: 517-30.
- Stall AM, Fariñas MC, Tarlinton DM, Lalor PA, Herzenberg LA, Strober S, Herzenberg LA. **Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals.** Proc Nat Acad Sci U S A 1988, 85: 7312-6.
- Starodubtseva MN. **Mechanical properties of cells and ageing.** Ageing Res Rev 2011, 10: 16-25.
- Steimer T. **The biology of fear- and anxiety-related behaviors.** Dialogues Clin Neurosci 2002 4: 231-49.
- Stemmelin J, Lazarus C, Caassel S, Kelche C, Cassel J-C. **Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats.** Neuroscience 2004, 96: 275-89.

- Step toe A, Owen N, Kunz-Ebrecht SR, Brydon L. **Loneliness and neuroendocrine, cardiovascular, and inflammatory stress responses in middle-aged men and women.** Psychoneuroendocrinology 2004; 29: 593-611.
- Stiller AL, Drugan RC, Hazi A, Kent SP. **Stress resilience and vulnerability: The association with rearing conditions, endocrine function, immunology, and anxious behavior.** Psychoneuroendocrinology 2011, 36: 1383-95.
- Stohlawetz P, Kolussi T, Jahandideh-Kazempour S, Kudlacek S, Graninger W, Willvonseder R, Pietschmann P. **The effect of age on the transendothelial migration of human T lymphocytes.** Scand J IMMunol 1996, 44: 530-4.
- Stout RD, Suttles J. **Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation by age-associated microenvironmental changes.** Immunol Rev 2005, 205: 60-71.
- Stout-Delgado HW, Du W, Shirali AC, Booth CJ, Goldstein DR. **Aging promotes neutrophil-induced mortality by augmenting IL-17 production during viral infection.** Cell Host Microbe 2009, 6: 446-56.
- Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Schölmerich J. **The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems.** Mech Ageing Dev 2001, 122: 1591-611.
- Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. **Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence.** J Neuroimmunol 2000, 109: 2197-202.
- Strehler BL. **Time, cells and aging.** New York: Academic Press 1977.
- Strewe C, Muckenthaler F, Feuerecker M, Yi B, Kaufmann I, Nichiporuk I, Vassilieva G, Hörl M, Matzel S, Schelling G, Thiel M, Morukov B, Chouker A. **Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses during 105 days of confinement.** J Appl Physiol (1985) 2015, 118: 1122-7.
- Su S, Dai W, Haynie DT, Simicevic N. **Use of the z-transform to investigate nanopulse penetration of biological matter.** Bioelectromagnetics 2005, 26: 389-97.
- Suchecki D, Tufik S. **Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats.** Am J Physiol 1997, 273: R1332-8.
- Sutbeyaz ST, Sezer N, Koseoglu F, Kibar S. **Low-frequency pulsed electromagnetic field therapy in fibromyalgia: a randomized, double-blind, sham-controlled clinical study.** Clin J Pain 2009, 25: 722-8.
- Tang Y, Di Pietro L, Feng Y, Wang X. **Increased TNF-alpha and PGI(2), but not NO release from macrophages in 18-month-old rats.** Mech Ageing Dev 2000, 114: 79-88.

- Tekle E, Oubrahim H, Dzekunov SM, Kolb JF, Schoenbach KH, Chock PB. **Selective field on intracellular vacuoles and vesicles membranes with nanosecond electric pulses.** Biophys J 2005, 89: 274-84.
- ter Horst JP, de Kloet ER, Schächinger H, Oitzl MS. **Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition.** Cell Mol Neurobiol 2012, 32: 725-35.
- Terlecki LJ, Pinel JPJ, Treit D. **Conditioned and unconditioned defensive burying in the rat.** Learn Motiv 1979, 10: 337-50.
- Terron MP, Paredes SD, Barriga C, Ortega E, Rodriguez AB. **Comparative study of the heterophil phagocytic function in Young and old ring doves (Streptopelia risoria) and its relationship with melatonin levels.** J Comp Physiol B 2004, 174: 421-7.
- Tesar BM, Du W, Shirali AC, Walker WE, Shen H, Goldstein DR. **Aging augments IL-17 T-cell alloimmune responses.** Am J Transplant 2009, 9: 54-63.
- Teunis MA, Heijnen CJ, Sluyter F, Bakker JM, Van Dam AM, Hof M, Cools R, Kavelaars A. **Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis at adult age.** J Neuroimmunol 2002, 133: 30-8.
- Tietze F. **Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione.** Anal Biochem 1969, 17:502-22.
- Tizabi Y, Aguilera G, Gilad GM. **Age-related reduction in pituitary corticotropin-releasing hormone receptors in two rat strains.** Neurobiol Aging 2003, 13: 227-30.
- Toledo-Rodríguez M, Sandi C. **Stress during adolescence increases novelty seeking and risk-taking behavior in male and female rats.** Front Behav Neurosci 2011, 5: 17.
- Tong BC, Barbul A. **Cellular and physiological effects of arginine.** Mini Rev Med Chem 2004, 4: 823-832.
- Torres-Sanchez ED, Gonzalez-Renovato ED, Pacheco-Moises FP, Romero-Davalos R, Romero-Tirado LA, Hernandez-Andalon JJ, Velazquez-Brizuela IE, Cruz-Ramos JA, Ortiz GG. **Beneficial effect of Nutrisim© against LPS-induced liver injury: oxidative stress markers and mitochondrial ATP-ase activity.** Int J Biol Chem 2013; 7: 38-46.
- Tortorella C, Piazzolla G, Spaccavento F, Vella F, Pace L, Antonaci S. **Regulatory role of extracellular matrix proteins in neutrophil respiratory burst during aging.** Mech Ageing Dev 2000, 119: 69-82.
- Tóth M, Halász J, Mikics E, Barsy B, Haller J. **Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood.** Behav Neurosci 2008, 122: 849-54.



- Toth M, Mikics E, Tulogdi A, Aliczki M, Haller J. **Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses.** Horm Behav 2011, 60: 28-36.
- Townsend KC, McWhirther BT. **Connectedness: a review of the literature with implications for counseling, assessment and research.** J Couns Dev 2005, 83: 191-201.
- Tsukamoto K, Machida K. **Effects of life events and stress on neutrophil functions in elderly men.** Immun Ageing 2012, 9:13.
- Turnbull AV, Rivier C. **Regulation of the HPA axis by cytokines.** Brain Behav Immun 1995, 9: 253-75.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. **Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses.** Nat Rev Neurosci 2009, 10: 397-409.
- Vaiserman AM. **Hormesis, adaptive epigenetic reorganization, and implications for human health and longevity.** Dose Response 2010, 8: 16-21.
- Valiutti S, Castellini F, Musiani P. **Effects of sulfurous (thermal) water on T lymphocyte proliferative response.** Ann Allergy 65: 463-8.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol 2007, 39: 44-84.
- Valzelli L. **The “isolation syndrome” in mice.** Psychopharmacologia 1973, 31: 305-20.
- Van den Biggelaar AH, De Craen AJ, Gussekloo J, Huizinga TW, Heijmans BT, Frölich M, Kirkwood TB, Westendorp RG. **Inflammation underlying cardiovascular mortality is a late consequence of evolutionary programming.** FASEB J 2004b, 18: 1022-4.
- Van den Biggelaar AH, Huizinga TW, de Craen AJ, Gussekloo J, Heijmans BT, Frölich M, Westendorp RG. **Impaired innate immunity predicts frailty in old age. The Leiden 85-plus study.** Exp Gerontol 2004a, 39: 1407-14.
- Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans V. **Male management: doping with aggression problems in male laboratory mice.** Lab Anim 2003, 37: 300-13.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. **Neural consequences of environmental enrichment.** Nat Rev Neurosci 2000, 1: 191-8.
- Vedhara K, Cox NK, Wilcock GK, Perks P, Hunt M, Anderson S, Lightman SL, Shanks NM. **Chronic stress in elderly carers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination.** Lancet 1999, 353: 627-31.

- Velázquez-Brizuela IE, Pacheco-Moisés FP, Romero-Dávalos R, Romero-Tirado LA, Hernández-Andalón JJ, Flores-Alvarado LJ, Bitzer-Quintero OK, González-Renovato ED, Alatorre-Jiménez MA, Sánchez-Lopez AL, Nuño-Penilla DG, Ortiz GG. **Effect of Nutrisim® and the interactive response of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in a model of septic shock induced by *E coli* serotype 0111:B4.** Am J of Biochem 2014; 4: 6-13.
- Vida C, Corpas I, De la Fuente M, González EM. **Age-related changes in xanthine oxidase activity and lipid peroxidation, as well as in the correlation between both parameters, in plasma and several organs from female mice.** J Physiol Biochem 2011, 67: 551-8.
- Vida C, De la Fuente M. **Stress-related behavioural responses, immunity and ageing in animal models.** En: Bosch JA, Phillips AC, Lord JM (Eds.). Immunosenescence: psychosocial and behavioral determinants. Springer, New York, 2013. pp: 125-144.
- Vida C, González EM, De la Fuente M. **Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety.** Curr Pharm Des 2014, 20: 4656-78.
- Vida C, Martínez De Toda I, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. **Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice.** Redox Biol 2017, 12: 423-37.
- Vieira MM, Ferreira TB, Pacheco PA, Barros PO, Almeida CR, Araujo-Lima CF, Silva-Filho RG, Higinio J, Andrade RM, Linhares UC, Andrade AF, Bento CA. **Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder.** J Neuroimmunol 2010, 229: 212-8.
- Villano Bonamin L, Barbuto JA, Malucelli BE. **Effects of social isolation on erlich tumor growth and tumor leukocyte infiltration in mice: evidence of participation of the submaxillary salivary gland.** Neuroimmunomodulation 2001, 9: 313-8.
- Viña J, Rodríguez-Mañas L, Salvador-Pascual A, Tarazona-Santabalbina FJ, Gomez-Cabrera MC. **Exercise: the lifelong supplement for healthy ageing and slowing down the onset of frailty.** J Physiol 2016, 594: 1989-99.
- Viña J. **Glutathione: metabolism and physiological functions.** CRC Press, 1990, Boca Ratón, Florida.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. **A model of premature ageing in mice based on altered stress-related behavioural response and immunosenescence.** Neuroimmunomodulation 2007, 14: 157-62.
- Viveros MP, Fernández B, Guayerbas N, De la Fuente M. **Behavioral characterization of a mouse model of premature immunosenescence.** J Neuroimmunol 2001, 114: 80-88.

- Viveros MP, Hernandez R, Martinez I, Gonzalez P. **Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat.** Rev Esp Fisiol 1988, 44: 315-21.
- Vizi ES, Elenkov IJ. **Non-synaptic norepinephrine release in neuro-immune responses.** Acta Biol Hung 2002, 53: 229-44.
- Volgelzangs N, Beekman AT, de Jonge P, Penninx BW. **Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort.** Transl Psychiatry 2013, 23: e249.
- Volkow ND, Logan J, Fowler JS, Wang GJ, Gur RC, Wong C, Felder C, Gatley SJ, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. **Association between age-related decline in brain dopamine activity and impairment in frontal and cingulate metabolism.** Am J Psychiatry 2000, 157: 75-80.
- Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. **Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases.** Curr Moll Med 2005, 5: 197-203.
- Wagner AK, Chen X, Kline AE, Li Y, Zafonte RD, Dixon CE. **Gender and environmental enrichment impact dopamine transporter expression after experimental traumatic brain injury.** Exp Neurol 2005, 195: 475-83.
- Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. **Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans.** J Clin Endocrinol Metab 2006, 91: 2738-48.
- Walston JD, Matteini AM, Nievergelt C, Lange LA, Fallin DM, Barzilai N, Ziv E, Pawlikowska L, Kwok P, Cummings SR, Kooperberg C, LaCroix A, Tracy RP, Atzmon G, Lange EM, Reiner AP. **Inflammation and stress-related candidate genes, plasma interleukin-6 levels, and longevity in older adults.** Exp Gerontol 2009, 44: 350-5.
- Wayne SJ, Rhyne RL, Garry PJ, Goodwin JS. **Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60.** J Gerontol 1990, 45: M45-8.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. **IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages.** Annu Rev Immunol 2007, 25: 821-52.
- Weinstein Y, Ran S, Segal S. **Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse.** J Immunol 1984, 132: 656-61.
- Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Relo AL, Nanz-Bahr NI, Feldon J. **Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat.** Behav Brain Res 2004, 152: 279-95.
- Weksler ME. **Changes in B cell repertoire with age.** Vaccine 2000, 18: 1624-8.

- Welberg L, Thrivikraman KV, Plotsky PM. **Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats.** Psychoneuroendocrinology 2006, 31: 553-64.
- Wesson DW, Wilson DA. **Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice.** Behav Brain Res 2011, 216: 408-13.
- Whiteman M, Cheung NS, Zhu Y, Chu SH, Jia-Ling S, Wong B, Armstrong JS, Moore PK. **Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?** Bioche Biophys Res Commun 2005, 326: 794-8.
- Wick G, Grubeck-Loebenstein B. **The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly.** Exp Gerontol 1997, 32: 401-13.
- Wiegert O, Joels M, Krugers H. **Timing is essential for rapid effects of corticosterone on synaptic potentiation in the mouse hippocampus.** Learning & Memory 2006; 13: 110-3.
- Williams GC. **Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence.** Evolution 1957, 2: 397-411.
- Won SJ, Lin MT. **Depletion of catecholamines with alpha-methyl-p-tyrosine suppresses splenic NK cell activity.** Int J Immunopharmacol 1989, 11: 451-7.
- Workman JL, Fonken LK, Gusfa J, Kassouf KM, Nelson RJ. **Post-weaning environmental enrichment alters affective responses and interacts with behavioral testing to alter nNOS immunoreactivity.** Pharmacol Biochem Behav 2011, 100: 25-32.
- Wright IK, Upton N, Marsden CA. **Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety.** Physiol Behav 1991, 50: 1129-32.
- Wu G, Feder A, Cohen H, Kim JJ, Calderon S, Charney DS, Mathé AA. **Understanding resilience.** Front Behav Neurosci 2013, 7: 10.
- Wu H, Wang J, Cacioppo JT, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB. **Chronic stress associated with spousal care giving of patients with Alzheimer's dementia is associated with down regulation of B-lymphocyte GH mRNA.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1999, 54: M212-5.
- Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. **Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by supressing immune responses in mice.** Life Sci 2000, 66: 1827-38.

- Wu W, Yamaura T, Murakami K, Ogasawara M, Hayashi K, Murata J, Saiki I. **Involvement of TNF-alpha in enhancement of invasion and metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells in mice by social isolation stress.** *Oncol Res* 1999, 11: 461-9.
- Yancik R, Ries LG. **Cancer in the aged. An epidemiologic perspective on treatment issues.** *Cancer* 1991, 68: 2502-10.
- Yang GD, Wang R. **H(2)S and cellular proliferation and apoptosis.** *Sheng Li Xue Bao* 2007, 59: 133-40.
- Yates FE. **Order and complexity in dynamical systems: homeodynamics as a generalized mechanics for biology.** *Math Comput Model* 1994, 19: 49-74.
- Yoon SO, Yun ChH, Cheng AS. **Dose effects of oxidative stress on signal transduction in aging.** *Mech Ageing Dev* 2002, 50: 1-8.
- Yorgason JT, España RA, Konstantopoulos JK, Weiner JL, Jones SR. **Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats.** *Eur J Neurosci* 2013, 37: 1022-31.
- Yuan H, Zheng JC, Liu P, Zhang SF, Xu JY, Bai LM. **Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory process.** *Neurosci Bull* 2007, 23: 125-30.
- Zafra C, Pena J, De la Fuente M. **Effect of microwaves on the activity of murine macrophages in vitro.** *Int Arch Allergy appl Immun* 1988, 85: 478-82.
- Zafra C. **Efecto de las radiaciones no ionizantes sobre el Sistema immune murino.** Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 1985.
- Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C, Sansoni P. **Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence.** *Exp Gerontol* 2003, 38: 981-7.
- Zhang WG, Zhu SY, Bai XJ, Zhao DL, Jiang SM, Li J, Li ZX, Fu B, Cai GY, Sun XF, Chen XM. **Select aging biomarkers based on telomere length and chronological age to build a biological age equation.** *Age* 2014, 36: 9639.
- Zhao B, Schwartz J. **Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives.** *J Neurosci Res* 1998, 52: 7-16.
- Zhao KS, Wang YF, Guéret R, Weksler ME. **Dysregulation of the humoral immune response in old mice.** *Int Immunol* 1995, 7: 929-34.
- Zheng Y, Wen J, Nguyen J, Cachia MA, Wang C, Sun Y. **Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia.** *Sci Rep* 2015, 5: 7613.

## Referencias

---

- Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwonskin LP. **Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex.** J Neurochem 2005, 93: 1434-43.
- Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwonskin LP. **Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex.** Behav Brain Res 2004, 148: 107-17.



**Anexo**





## ANEXO

A continuación se enumera la relación de trabajos derivados de la presente tesis doctoral:

1. De la Fuente M, **Cruces J**, Hernandez O, Ortega E. **Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects**. Curr Pharm des 2011, 17: 3966-93.
2. **Cruces J**, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. **The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication**. Curr Pharm Des 2014, 20: 4608-28.
3. **Cruces J**, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M. **A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response**. J Neuroimmunol 2014, 277: 18-25.
4. **Cruces J**, Portal-Núñez S, Fernández-Tresguerres JA, De la Fuente M. **Loneliness and social isolation worsen immunity in the elderly**. Approaches to Aging Control 2015, 19: 7-16.
5. Hernández Torres A, **Cruces J**, Mate I, Garrido A, Hernández O, De la Fuente M. **Beneficial effects on immunity and longevity in a mouse model of social isolation**. Nutr Hosp 2015, 32: 10307.
6. Esteban-Manzanares G, González-Bermúdez B, **Cruces J**, De la Fuente M, Li Q, Guinea GV, Pérez-Rigueiro J, Elices M, Plaza GR. **Improved measurements of elastic properties of cells by micropipette aspiration and its application to lymphocytes**. Ann Biomed Eng 2017, doi: 10.1007/s10439-017-1795-7.
7. **Cruces J**, Mate I, Garrido A, De la Fuente M. **Environmental enrichment reverts behavioral and immunological impairments and increases life span in prematurely aging mice**. En preparación.

Otras publicaciones relacionadas con la presente tesis:

1. De la Fuente M, Llorente R, Baeza I, De Castro NM, Arranz L, **Cruces J**, Viveros MP. **Early maternal deprivation in rats: a proposed animal model for the study of developmental neuroimmunoendocrine interactions**. Ann N Y Acad Sci 2009, 1153: 176-83.
2. Portal-Núñez S, **Cruces J**, Gutiérrez-Rojas I, Lozano D, Ardura JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, De la Fuente M, Esbrit P. **The vertebrae of prematurely aging mice as a skeletal model of involutional osteoporosis**. Histol Histopathol 2013, 28: 1473-81.
3. Gomez A, Sánchez-Román I, Gomez J, **Cruces J**, Mate I, Lopez-Torres M, Naudi A, Portero-Otín M, Pamplona R, De la Fuente M, Barja G. **Lifelong treatment with atenolol decreases membrane fatty acid unsaturation and oxidative stress in heart and skeletal muscle mitochondria and improves immunity and behavior, without changing mice longevity**. Aging Cell 2014, 13: 551-60.
4. Daza R, **Cruces J**, Arroyo-Hernández M, Marí-Buyé N, De la Fuente M, Plaza GR, Elices M, Pérez-Rigueiro J, Guinea GV. **Topographical and mechanical characterization of living eukaryotic cells on opaque substrates: development of a general procedure and its application to the study of non-adherent lymphocytes**. Phys Biol 2015, 12: 026005.

5. Martínez De Toda I, Mate I, Vida C, **Cruces J**, De la Fuente M. **Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity.** Aging (Albany NY) 2016, 8: 3110-9.
6. Vida C, de Toda IM, **Cruces J**, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. **Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice.** Redox Biol 2017, 12: 423-37.



